



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DIFERENCIAL DE GENES
ALVO EM *Crassostrea brasiliana* EXPOSTAS *IN SITU* NO
MANGUEZAL DO ITACORUBI, FLORIANÓPOLIS, SC**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura da
Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial à obtenção do título
de Mestre.

Orientadora: Maria Risoleta Freire Marques

ARNALDO CECHINEL BITTENCOURT

FLORIANÓPOLIS
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bittencourt, Arnaldo Cechinel

Avaliação da transcrição diferencial de genes alvo em
Crassostrea brasiliana expostas in situ no manguezal do
Itacorubi, Florianópolis, SC / Arnaldo Cechinel
Bittencourt ; orientadora, Maria Risoleta Freire Marques -
Florianópolis, SC, 2013.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Ostras. 3. Biomarcadores. 4. Esgoto
Sanitário. 5. Manguezal. I. Marques, Maria Risoleta
Freire. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Avaliação da transcrição diferencial de genes alvo em
Crassostrea brasiliana expostas *in situ* no manguezal do
Itacorubi, Florianópolis, SC**

Por

ARNALDO CECHINEL BITTENCOURT

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aqüicultura.

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dra. Maria Risoleta Freire Marques – *Orientadora*

Dra. Karim Hahn Lüchmann

Dr. Luiz Augusto Santos Madureira

Dr. Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque

*“All have their worth
and each contributes to
the worth of the others.”*

(J.R.R. Tolkien)

**Dedico esse trabalho as
mulheres mais admiráveis
que existem: minha mãe e
minhas avós.**

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha família! Especialmente a minha mãe, Rosane, por todos os ensinamentos e por ter sempre acreditado em mim; ao meu irmão e melhor amigo, Daniel, pelo seu companheirismo e conselhos verdadeiros; as minhas avós maravilhosas, Odette e Yvalda, por todo amor e compaixão; e ao meu pai, Ronaldo, pelo apoio e incentivo.

Agradeço imensamente a minha amiga, conselheira e orientadora, “Riso” por toda a confiança depositada, conselhos, risadas e ter me “adotado” como um filho. Uma pessoa extraordinária.

Ao amigo e co-orientador, Afonso, por todo o incentivo, indicações, e por ter me acolhido dentro do seu grupo de pesquisa. Grande atacante, tenho que reconhecer que as confraternizações do laboratório em sua casa “bbq pool party sunset” foram sensacionais.

A todos os companheiros do LABCAI (Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica); em especial ao meu “guru”, Jacó, por sua paciência, ensinamentos e supervisão; a todas as meninas que fazem parte do grupo pela simpatia e por ter deixado o ambiente de trabalho tão amistoso, florido e harmonioso; especialmente a Claudia, Karin, “Lila” e a Flávia, pelas conversas, conselhos e a ajuda no desenho dos iniciadores. Ao Clei pela parceria nas exposições e ao Fabrício pelas dicas. Ainda ao meu amigo companheiro de surfe, Vinícius; ao amigo e colega da oceanografia, Álvaro; e a companheira de trabalho, Naissa, pela ajuda na coleta das minhas amostras.

Ao professor Alcir Dafre e pessoal do LABDEF (Laboratório de Defesas Celulares da UFSC), Daiana e Rafael Trevisan, pela ajuda no delineamento, coleta e execução dos experimentos.

Ao pessoal do LMM (Laboratório de Moluscos Marinhos da UFSC), onde estagiei durante parte da minha graduação, fiz grandes amigos e pude contar prontamente com as ostras utilizadas nesse trabalho: professor Cláudio Melo, “Tatu”, “Pancho”, “Marcão”, e o professor Jaime Ferreira.

Ao Laboratório de Química Orgânica do Instituto Oceanográfico, da Universidade de São Paulo (USP) e ao Laboratório de Hidroquímica, da Universidade Federal de Rio Grande (FURG) pela parceria nas análises de contaminantes orgânicos e de metais.

Ao secretario, “Carlito”, e todos os professores do PPGAQI (Programa de Pós-Graduação em Aquicultura) por toda a organização e comprometimento que mantêm o nível do programa.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e ao INCT-TA (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxicologia Aquática) pelo financiamento deste trabalho.

A Deus, por toda a diversidade e beleza de sua criação, e por sempre estar ao meu lado.

RESUMO

Ambientes costeiros marinhos, especialmente sistemas semi-fechados como manguezais, são altamente susceptíveis à contaminação causada pelo desenvolvimento urbano e industrial. Organismos sentinela têm sido propostos como bioindicadores de contaminação aquática, através da avaliação de alterações biológicas desencadeadas por xenobióticos presentes no ambiente, as quais expressam a exposição aos mesmos e/ou seus efeitos. *Crassostrea brasiliana* é uma espécie de ostra eurialina que habita áreas de manguezal ao longo de toda a costa brasileira. O objetivo do presente estudo foi investigar a transcrição diferencial de genes selecionados como alvo em *C. brasiliana* e avaliar seu potencial como biomarcadores moleculares relacionados ao estresse causado pela contaminação do Manguezal do Itacorubi, em Florianópolis, SC. Situado dentro do perímetro urbano do município esta área vem sofrendo constante pressão antrópica, principalmente pelo aporte de esgoto sanitário não-tratado. Ostras provenientes de um cultivo e aclimatadas por uma semana em laboratório foram transplantadas para duas áreas. Uma localizada no manguezal do Itacorubi, área densamente povoada, e outra localizada no manguezal do Ratoões, área pristina, que foi considerada como local de referência (RAT). No manguezal do Itacorubi, as ostras foram transplantadas para dois pontos distintos (ITAI e ITAII). Foram realizadas duas exposições, uma no início do verão 2011/2012 (EXP1) e outra após a temporada de verão (EXP2). Exemplares coletados em 24h e 96h após a exposição *in situ*, tiveram suas brânquias dissecadas, o mRNA foi extraído e por transcrição reversa foi obtido o cDNA. Através do uso de PCR em tempo real (*qPCR*) foram quantificados os níveis de transcritos de genes alvo nas ostras expostas em comparação ao grupo referência. Com base no transcriptoma da *C. brasiliana*, previamente realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foram selecionados, como genes alvo para validação neste estudo de campo, os genes Citocromo P450 (*CYP2A1* e *CYP2B-like*), *Fatty Acid Binding Protein (FABP)*, Sulfotransferase1C1 (*SULT*), Glutathione S-transferases (*GST Ω* e *GSTmicrosomal*), Glutathione Peroxidase (*GPx*), Catalase (*CAT*) e Superóxido Dismutase (*SOD*), os quais estão associados, principalmente, às respostas de defesa contra o estresse oxidativo e com o processo de biotransformação. O mesmo padrão de transcrição foi constatado nos dois experimentos no tempo de exposição de 24h para os genes *FABP*, *SULT*, *CYP2A1* e *CYP2B-like*, assim como para *FABP* no tempo de 96h. A transcrição de outros genes, como *CAT* em 24h e *CYP2A1*, *CYP2B*, *GST Ω* e *GSTmicrosomal* em

96h, mostraram diferenças nos níveis de transcritos entre os grupos expostos e o grupo referência, porém não apresentaram o mesmo padrão de transcrição na análise comparativa entre as duas exposições *in situ* realizadas. Os níveis mais elevados de transcritos de *FABP*, *SULT* e CYPs (*CYP2B1-like* e *CYP2A1*) em ostras do mangue, *C. brasiliensis*, observados para ITAI em 24h, nas duas exposições *in situ*, permitem sugerir a validação desses genes como biomarcadores de contaminação ambiental por esgoto sanitário.

Palavras chave: biomarcadores moleculares, ostra do mangue, bioindicador, esgoto sanitário.

ABSTRACT

Coastal marine environments, specially semi-enclosed systems like mangroves, are highly susceptible to contamination caused by urban and industrial development. Itacorubi mangrove, located within the city limits of Florianópolis, Santa Catarina, southern Brazil, has been experiencing constant anthropogenic pressure, mainly by the inflow of domestic sewage. Besides the risk to human health, associated to pathogens and toxins, degradation of the water quality, increase of biological oxygen demand (BOD) and suppression of aquatic species may arise due to eutrophication. Filter-feeding molluscs have been widely used as bioindicator organisms in coastal water quality monitoring programs. The aim of this study was to evaluate the transcription of some target genes in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliiana* and therefore their potential as molecular biomarkers of exposure to sewage. Farmed specimens of *C. brasiliiana* were simultaneously transplanted to two sites at Itacorubi mangrove and to a third site at Ratones, a mangrove pristine area. We conducted two experiments, one in early summer 2011/2012 (EXP1) and another at the end of the summer season (EXP2). mRNA was extracted from gill tissue sampled at 24 and 96 hours after *in situ* exposure and cDNA was used to assess transcript levels of potential biomarker candidate genes by quantitative real-time PCR (qPCR). At 24 hours, transcription of *FABP*, *SULT*, *CYP* (*CYP2B1*-like and *CYP2A1*) was induced. Transcription of *FABP* was also induced at 96 hours. Transcription of other genes, like *CAT* at 24 hours, and *CYP2A1*, *CYP2B*, *GST Ω* and *GSTmicrosomal* at 96h, was shown to be different between reference and exposed groups, but did not show the same transcription pattern in the comparative analysis between the two *in situ* experiments. The increased levels of *FABP*, *SULT*, *CYP2B1* and *CYP2A1* transcripts in the mangrove oyster *C. brasiliiana*, seen after 24 hours in ITAI, for both *in situ* experiments suggest the validation of these gene as biomarkers of environment contamination by sewage.

Keywords: molecular biomarkers, mangrove oyster, bioindicator, sewage.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Paradigma da Ecotoxicologia. Biomarcadores são sinais precoces a degradação, com menor interferência de variáveis e maior relevância do que estudos macroecológicos (Adaptado de MOORE et al., 2004).....	25
FIGURA 2 – Mapa de localização dos pontos de amostragem, onde foram instaladas as balsas de monitoramento.....	36
FIGURA 3 – Instalação das balsas de monitoramento.....	37
FIGURA 4 – Artefato utilizado para a coleta das amostras de água.....	42
FIGURA 5 – O esquema mostra a amplitude da maré ao longo dos dias durante a exposição pré-verão, e os respectivos parâmetros ambientais no exato momento da coleta em cada ponto de amostragem (RAT, ITAI e ITAII). As tabelas indicam os valores de oxigênio dissolvido (O.D.), porcentagem de saturação de oxigênio (Saturação), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), coliformes fecais e totais, e precipitação acumulada nas últimas 24h de exposição	47
FIGURA 6 – O esquema mostra a amplitude da maré ao longo dos dias durante a exposição pós-verão, e os respectivos parâmetros ambientais no exato momento da coleta em cada ponto de amostragem (RAT, ITAI e ITAII). As tabelas indicam os valores de oxigênio dissolvido (O.D.), porcentagem de saturação de oxigênio (Saturação), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), coliformes fecais e totais, e precipitação acumulada nas últimas 24h de exposição	48
FIGURA 7 – Níveis de transcritos relativos dos genes putativos de <i>FABP</i> e <i>Sulfotransferase1C1 (SULT)</i> em 24h e 96h de exposição, nos experimentos pré-verão e pós-verão. Os níveis de transcritos foram avaliados por <i>qPCR</i> e a transcrição nos grupos expostos (ITAI e ITAII) é relativa ao grupo referência (RAT).....	51
FIGURA 8 – Níveis de transcritos relativos dos genes putativos de <i>CYP2A1</i> e <i>CYP2B</i> em 24h e 96h de exposição, nos experimentos pré-verão e pós-verão. Os níveis de transcritos foram avaliados por <i>qPCR</i> e a transcrição nos grupos expostos (ITAI e ITAII) é relativa ao grupo referência (RAT).....	52

FIGURA 9 – Níveis de transcritos relativos dos genes putativos de *ALAd* e *HSP70* em 24h e 96h de exposição, nos experimentos pré-verão e pós-verão. Os níveis de transcritos foram avaliados por *qPCR* e a transcrição nos grupos expostos (ITAI e ITAII) é relativa ao grupo referência (RAT)..... 53

FIGURA 10 – Níveis de transcritos relativos dos genes putativos de *GSTmicrossomal (GSTm)* e *GSTômega (GSTΩ)* em 24h e 96h de exposição, nos experimentos pré-verão e pós-verão. Os níveis de transcritos foram avaliados por *qPCR* e a transcrição nos grupos expostos (ITAI e ITAII) é relativa ao grupo referência (RAT)..... 54

FIGURA 11 – Níveis de transcritos relativos dos genes putativos de *CAT*, *SOD* e *GPx* em 24h e 96h de exposição, nos experimentos pré-verão e pós-verão. Os níveis de transcritos foram avaliados por *qPCR* e a transcrição nos grupos expostos (ITAI e ITAII) é relativa ao grupo referência (RAT)..... 55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Iniciadores para os genes de <i>C. brasiliiana</i> que foram utilizados nas reações de <i>qPCR</i> , e os tamanhos dos produtos esperados.....	40
TABELA 2 – O programa utilizado nas reações de <i>qPCR</i>	41
TABELA 3 – Os parâmetros ambientais no exato momento da coleta em cada ponto de amostragem, indicando os valores de temperatura da água, salinidade, oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio, saturação de oxigênio, transparência, condutividade e pH.....	44
TABELA 4 – Valores de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) no tecido das ostras na exposição pré-verão em ng.g^{-1} de peso seco.....	45
TABELA 5 – Valores encontrados no sedimento ao final de cada exposição para Bifenilas Policloradas (PCBs), Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) e Alquilbenzeno Lineares (LABs) em ng.g^{-1} de peso seco.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AhR, do inglês – *Aryl hidrocarbon Receptor* (receptor de hidrocarboneto aromático)
ALAd – ácido δ -aminolevulínico desidratase
ALAs – 5-aminolevulinato sintase
ANOVA – análise de variância (teste estatístico)
APP – Área de Preservação Permanente
BNF – beta-naftoflavona
CAR, do inglês – *Constitutively Androstane Receptor* (receptor constitutivo de androstano)
CAT – catalase
cDNA – sequência nucleotídica complementar de DNA
cm – centímetros
CONAMA – Comissão Nacional do Meio Ambiente
CYP – citocromo P450
DBO – demanda bioquímica de oxigênio
DNA – ácido desoxirribonucleico
EDC, do inglês – *Endocrine Disrupters Chemicals* (desreguladores endócrinos)
ERO – espécie reativa de oxigênio
FABP, do inglês – *Fatty Acid Binding Protein* (proteína de ligação a ácidos graxos)
g – gramas
GPx – Glutathione Peroxidase
GST – Glutathione S-transferase
HPA – hidrocarboneto policíclico aromático
HSP – do inglês: *Heat Shock Protein* (proteína de choque térmico)
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICMBIO – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
INCT-TA – Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia em Toxicologia Aquática
INMET – Instituto Nacional de Meteorologia
ITAI – ponto de exposição 1 no Itacorubi
ITAI – ponto de exposição 2 no Itacorubi
LAB – alquilbenzeno linear
LABCAI – Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica
LMM – Laboratório de Moluscos Marinhos
mg – miligrama

mg/L – miligrama por litro
mg/mL – miligrama por mililitro
mL – mililitro
ng.g⁻¹ – nanograma por grama
nm – nanômetro
NMP/100mL – número mais provável por cem mililitro
NR – do inglês: *Nuclear Receptors* (receptores nucleares)
PCB – bifenila policlorada
PCP – do inglês: *Personal Care Product* (produto de cuidado pessoal)
PCR – do inglês: *Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
PPAR – do inglês: *Peroxisomal Proliferator Activated Receptor* (receptor ativado por proliferação peroxisomal)
ppt – do inglês: *parts per thousand* (partes por mil)
PXR – do inglês: *Pregnane X Receptor* (receptor pregnano X)
RAT – ponto de referência no Ratos
RNA – ácido ribonucleico
OD – oxigênio dissolvido
seg – segundos
SOD – Superóxido Dismutase
SULT – Sulfotransferase
TRIR, do inglês – *Total RNA Isolation Reagent* (reagente para o isolamento do RNA total)
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
°C – graus centígrados
µg – micrograma
µg – microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1. Ambientes costeiros, saneamento e a questão sócio-ambiental....	23
1.2. Avaliação de risco ecológico e biomarcadores.....	24
1.3. Ecotoxicogenômica e biomarcadores moleculares.....	26
1.4. Moluscos bivalves como organismos bioindicadores.....	27
1.5. Enzimas Associadas a biotransformação de xenobióticos e a defesas antioxidantes.....	28
1.6. Problemática da área de estudo.....	31
2. JUSTIFICATIVA.....	32
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. Objetivo geral.....	34
3.2. Objetivos específicos.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1. Área de estudo e desenho experimental.....	35
4.2. Preparação das amostras.....	37
4.2.1. Extração de RNA total.....	38
4.2.2. Síntese do cDNA.....	38
4.3. PCR em tempo real (<i>qPCR</i>).....	39
4.3.1. Desenho de iniciadores (“ <i>Primers</i> ”).....	39
4.3.2. Padronização das condições de <i>qPCR</i>	41
4.3.3. Análise dos resultados.....	41
4.4. Parâmetros ambientais.....	42
4.5. Análise estatística.....	43
5. RESULTADOS.....	44
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÕES.....	67
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ambientes costeiros, saneamento e a questão sócio-ambiental

Em dezembro de 2003, a Assembleia Geral das Nações Unidas aprovou a Resolução 58/217 proclamando 2005-2015 como Década Internacional para a Ação - "Água para a Vida". A Resolução demanda ações mais efetivas nas questões relacionadas à água e ao desenvolvimento, em particular, aquela envolvendo reduzir pela metade, até 2015, a proporção de pessoas sem acesso à água potável e saneamento básico. Estas são questões extremamente relevantes, mas sua importância não deve suplantiar o fato de que essa Resolução vem em um momento em que a biodiversidade e os recursos biológicos como um todo estão enfrentando ameaças crescentes sem precedentes causadas pelo homem (DUDGEON et al., 2006).

O Brasil possui aproximadamente 8,5 mil km de costa, onde se concentram cerca de 75% dos principais centros urbanos, dispostos ao longo do litoral, sendo que cerca de 80% de sua população vivem a não mais de 200 km do mar (SERAFIM; HAZIN, 2005). O grande contingente de população na zona costeira e sua concentração em alguns pontos da costa, associados à carência de saneamento ambiental, especialmente de coleta e tratamento de esgotos doméstico e industrial, causam grandes impactos sobre o meio ambiente, com implicações sobre a qualidade da água no litoral, afetando a pesca e a atividade turística (IBGE, 2010).

Segundo o IBGE (2010), mais de 80% dos moradores de áreas urbanas são providos de rede geral de esgotamento sanitário ou de fossa séptica. Porém, nas zonas urbanas do estado de Santa Catarina apenas 31,9% são beneficiados pela rede coletora, enquanto a grande maioria, 54,6% mora em domicílios providos de fossa séptica, 9,5% utilizam fossas rudimentares e 3,6% não possuem qualquer tipo de tratamento, utilizando diretamente valas, rios, lagos ou mar como destino para despejo ou descarte. Quase 75% do esgoto sanitário coletado nas cidades são despejados "*in natura*", o que contribui decisivamente para a contaminação dos cursos de água urbanos e das praias (COSTA, 2010).

Problemas relacionados à contaminação ambiental podem ser considerados como pandemia. Apesar do progresso considerável de alguns países industrializados na redução da contaminação de origem doméstica e industrial, sinais de degradação ambiental relacionados ao enriquecimento excessivo de nutrientes (SMITH et al., 2006) e/ou

produtos químicos, como desreguladores endócrinos estão crescendo (COLBORN et al., 1997).

O esgoto sanitário é a principal fonte de contaminantes em ambientes costeiros (KENNISH, 1991). Seus efluentes, considerados como uma das principais causas da degradação ambiental, colocam em risco a biodiversidade e causam impacto negativo sobre a homeostase dos organismos, incluindo o homem. Pesquisas mostram que a produção de esgoto doméstico em áreas costeiras aumenta consideravelmente nos períodos de férias e finais de semana (BRAGA et al., 2000), já que a população tende a dobrar devido ao movimento nas praias.

É impossível de determinar a composição exata do esgoto, mais seus efluentes podem conter, de modo geral, grandes quantidades de matéria orgânica e contaminantes diversos, como fármacos, produtos de higiene pessoal, produtos de limpeza doméstica, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, metais traço, entre outros (PETROVIC, 2003). Além disso, potenciais desreguladores endócrinos, ou seja, compostos sintéticos ou naturais com capacidade de alterar o sistema endócrino dos animais podem ser também encontrados no esgoto sanitário (BOGERS et al., 2007), além da contaminação biológica por patógenos virais e bacterianos (PARASHAR et al., 2003).

O grande desafio na avaliação de risco, como parte da gestão ambiental integrada, é a de associar os danos sofridos pelos organismos decorrentes da contaminação ambiental e suas consequências ecológicas. Este obstáculo resulta em um entrave no desenvolvimento de políticas eficazes para a utilização sustentável dos recursos naturais de estratégias de proteção ambiental (MOORE et al., 2004).

1.2. Avaliação de risco ecológico e biomarcadores

Como o objetivo da avaliação de risco ecológico é a preservação de um ecossistema, a medição do grau de toxicidade de contaminantes em espécies sensíveis pode ser um indício precoce do declínio da população, portanto um parâmetro adequado e ecologicamente relevante (EPA, 1998). Avaliar o risco ecológico de inúmeros poluentes e seus derivados, através de estudos macroecológicos (populações e comunidades), é extremamente complexo. Além de sofrerem interferência de inúmeros fatores externos e serem de difícil detecção, os efeitos observáveis tendem a se manifestar após longos períodos de exposição (MOORE et al., 2004).

Uma série de marcadores ou biomarcadores moleculares, bioquímicos, celulares, histológicos e fisiológicos têm sido aplicados na

avaliação dos efeitos biológicos de vários tipos de contaminantes em animais aquáticos, bem como para avaliar o estado e o grau de vulnerabilidade dos ecossistemas marinhos (BAINY et al., 2000; GALLOWAY, 2006; PEREIRA et al., 2007; LOSSO; GHIRARDINI, 2010; MILAN et al., 2011). Os biomarcadores moleculares e bioquímicos apresentam a vantagem de servirem de sinal precoce da degradação ambiental causadas pelos contaminantes (RAND, 1995; PEREIRA et al., 2007), antecipando assim possíveis danos em maior escala, tais como efeitos deletérios nas populações e comunidades biológicas (CAJARAVILLE et al., 2000). Como mostra a figura abaixo, distúrbios ecológicos, como perda de biodiversidade, destruição do habitat, declínio populacional, acabam sendo consequências irreversíveis da contaminação ambiental.

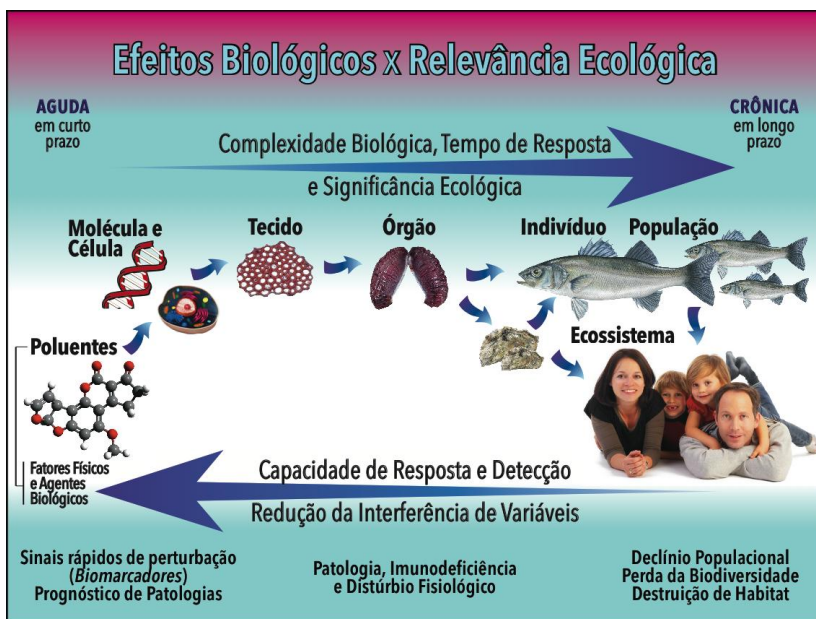


FIGURA 1 – Paradigma da Ecotoxicologia. Biomarcadores são sinais precoces da degradação, com menor interferência de variáveis e maior relevância do que estudos macroecológicos (Adaptado de MOORE et al., 2004).

Neste contexto, chama-se de biomarcador qualquer substância, ou seu derivado, estrutura ou processo, que possa ser medido no organismo e que possa prever ou influenciar a incidência de um evento, um distúrbio fisiológico ou uma doença ou patologia (WHO, 2001). Sua

utilização ou aplicação está intimamente associado com a Ecotoxicologia, um domínio da ciência, cujo objetivo é entender e prever efeitos de xenobióticos em comunidades naturais sob pressão antrópica (CHAPMAN, 2002). Xenobiótico é um termo utilizado para se referir a qualquer substância química que pode ser encontrada num organismo mas que não é normalmente produzida ou que não se espera estar presente no mesmo, embora seja comumente utilizado para se referir a substâncias poluentes, ou seja, substâncias estranhas para todo um sistema biológico (i.e. substâncias artificiais). Em vista disso, biomarcadores bioquímicos de contaminação em organismos aquáticos têm sido incorporados em programas de monitoramento para a avaliação de risco ambiental, como na Europa (CAJARAVILLE et al., 2000), Estados Unidos (KIMBROUGH et al., 2008) e no Brasil (VENTURA, E. C., 2004).

1.3. Ecotoxicogenômica e biomarcadores moleculares

Em um contexto ecotoxicológico, biomarcadores são definidos como alterações biológicas, de caráter molecular, celular ou fisiológico, que expressam os efeitos tóxicos causados pelos contaminantes ambientais (WALKER et al., 1996).

Paralelamente à utilização de biomarcadores bioquímicos clássicos, técnicas disponibilizadas pela ciência genômica estão sendo padronizadas e aplicadas em estudos ecotoxicológicos, com o intuito de compreender os mecanismos moleculares envolvidos nas respostas de organismos expostos a contaminantes ambientais (PRIETO-ÁLAMO et al., 2010; CHAPMAN et al., 2011). A análise genômica e transcriptômica de bivalves são áreas emergentes considerando a sua aplicação na aquicultura, recursos pesqueiros e ciências ambientais (SAAVEDRA; BACHÈRE, 2006). Com o advento dessas técnicas, genomas (ZHANG et al., 2012) e transcriptomas (MILAN et al., 2011; CHAPMAN et al., 2011; LÜCHMANN, 2012) de moluscos bivalves têm revelado uma grande quantidade de informação. Como consequência, surge agora o grande desafio de relacionar a expressão de certos genes do metabolismo de xenobióticos com as respostas de adaptação e/ou defesa frente à presença de patógenos e ao estresse ambiental.

De modo geral, a exposição dos organismos a contaminantes ambientais, ou xenobióticos, acarreta, como primeira consequência, alterações no nível da transcrição gênica, a qual pode sofrer um aumento ou uma diminuição (BRULLE et al. 2008). Estas alterações decorrem do

efeito modulador do xenobiótico sobre a interação de receptores celulares com sequência alvo do DNA. Técnicas que avaliem a expressão gênica de forma quantitativa, como, por exemplo, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real (*qPCR*), podem ser utilizadas para validar a transcrição diferencial de genes. A *qPCR* é considerada como o método mais sensível e confiável para detecção e quantificação de ácidos nucleicos, podendo ser utilizada para quantificar os níveis de transcrição de genes de interesse para serem utilizados em programas de monitoramento ambiental. Esta abordagem permite a análise comparativa mais segura dos níveis de transcrição de genes entre duas ou mais amostras provenientes de condições e/ou tratamentos distintos.

Programas de monitoramento ambiental já estão utilizando esta metodologia para analisar, simultaneamente, dezenas ou centenas de genes biomarcadores de contaminação aquática, já caracterizados e/ou potenciais, visando relacionar um dado padrão com o grau de contaminação do ambiente (MEDEIROS; SIEBERT; TOLEDO E SILVA, DE; et al., 2008; TOLEDO-SILVA et al., 2008; MILAN et al., 2011; LÜCHMANN et al., 2012).

Os genes com potencial para utilização como biomarcadores de contaminação ambiental, selecionados como genes alvo para análise e validação neste estudo, estão entre aqueles identificados como integrantes do perfil das respostas moleculares de defesa de moluscos bivalves. Estes genes mostraram-se como sendo transcritos diferencialmente frente ao estresse causado pela exposição a diversos contaminantes em condições de laboratório. Entre estes genes, estão aqueles relacionados ao estresse celular ao sistema imune, ao metabolismo energético e ao metabolismo de biotransformação. Este perfil global das respostas transcriptômicas destes organismos frente à exposição a contaminantes tem sido delineado com base em diversos trabalhos pretéritos do grupo do LABCAI, entre eles Medeiros et al. (2008), Zanette (2009) e Lückmann et al (2012).

1.4. Moluscos bivalves como organismos bioindicadores

Moluscos bivalves marinhos ganharam uma importância global como organismos bioindicadores de contaminação marinha e estuarina (CAJARAVILLE et al., 2000). Por serem animais sésseis, filtradores, com alta capacidade de alimentação e bioacumulação de compostos orgânicos e inorgânicos (ORTIZ-ZARRAGOITIA; CAJARAVILLE, 2006), diversos programas de monitoramento de ambientes costeiros

têm utilizado moluscos bivalves, como ostras e mexilhões, de modo a indicar, através da bioacumulação e de alterações biológicas, tanto a presença quanto a exposição a esses contaminantes (SCANES, 1997; KIMBROUGH et al., 2008). Efeitos de contaminantes nos processos fisiológicos, incluindo a reprodução, são comumente observados em moluscos bivalves marinhos. Os efeitos mais comuns são a atresia e a reabsorção de gametas, a realocação de reservas energéticas entre reprodução e demandas metabólicas, e anormalidades histológicas, especialmente do tecido branquial (CLAYTON, 1996).

A ostra do mangue *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) é uma espécie nativa do Brasil, encontrada em regiões estuarinas, como manguezais, com grande potencial para utilização em estudos de monitoramento ambiental por ser facilmente encontrada ao longo de toda costa do país.

Lüchmann et al. (2011) comparou a atividade enzimática e outros biomarcadores com as concentrações de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos nas brânquias e glândula digestiva de *C. brasiliana* expostas a fração de óleo diesel acomodada em água, verificou-se a bioacumulação dose-dependente desses hidrocarbonetos e a resposta de algumas defesas antioxidantes, especialmente nas brânquias, sugerindo esse tecido como o que responde melhor a uma exposição aguda e propondo a utilização deste animal como organismo modelo em programas de biomonitoramento. Outro estudo que comparou a atividade enzimática (GST, G6PDH, CAT e AChE) nas glândulas digestivas de *Crassostrea rizophora*, espécie que posteriormente foi renomeada a *C. brasiliana*, expostas por sete dias a fração de óleo diesel acomodada em água em diferentes salinidades, revelou que a atividade da GST pode ser utilizada como biomarcador de exposição a óleo diesel em locais com salinidade entre 15 e 25ppt, valores normalmente observados em áreas de manguezal (SILVA, DA et al., 2005).

1.5. Enzimas Associadas à biotransformação de xenobióticos e defesa antioxidante

Em eucariotos, a biotransformação da maioria dos xenobióticos lipofílicos pode ser dividida em três fases.

Durante a Fase I, grupos polares são introduzidos na molécula xenobiótica. Essa reação é geralmente mediada por enzimas da família do Citocromo P450 (CYP), que catalisam as reações de hidroxilação, epoxidação, desalquilação, de desaminação, sulfoxidação e dessulfuração (WALKER et al., 1996). O Citocromo P450 é uma

hemeproteína com diversas isoformas, codificada por uma superfamília de genes presente no genoma de todos os filos (HANNEMANN et al., 2007). Hemeproteínas têm como principal característica a presença de um grupo prostético heme contendo ferro que é capaz de realizar reações de oxiredução. A enzima ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAd) catalisa o segundo passo da síntese do heme, a adição assimétrica de duas moléculas de ácido aminolevulínico para formar o porfobilinogênio monopirrolíco (KELADA et al., 2001).

As reações de Fase I reduzem a lipofilicidade dos xenobióticos através da adição de um grupo funcional polar, (ex. um grupo hidroxila) e, em alguns casos, o metabólito já se encontra mais hidrofílico e está pronto para excreção. Caso contrário, prossegue para reações de conjugação com vários compostos endógenos, tais como a glutatona (GSH), ácido glicurônico e sulfato, que diminuem ainda mais as suas propriedades lipofílicas (REGOLI; GIULIANI, 2013). Esse metabolismo adicional por conjugação de substratos endógenos polares são descritos como as reações de Fase II, e são catalisadas principalmente por enzimas como a glutatona-S-transferases (GSTs) e sulfotransferases (SULTs), como por exemplo a conjugação da GSH mediada pelas GSTs (WALKER et al., 1996). De acordo com a sequência dos resíduos de aminoácidos da região N-terminal, da formação de imunocomplexos com anticorpos específicos e da sensibilidade a inibidores, as GSTs têm sido classificadas em diferentes classes, como ômega, alpha, beta, delta, mu, mega, pi, sigma, tau, theta e zeta (SHEEHAN et al., 2001).

Além das estratégias bioquímicas descritas, os sistemas responsáveis por exportar os produtos da biotransformação para fora da célula são descritos como Fase III de biotransformação (KURELEC, 1992).

Vias metabólicas mediadas pela atividade de enzimas oxido-redutoras, têm o potencial de aumentar significativamente a formação intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) (REGOLI; GIULIANI, 2013). Assim, xenobióticos podem induzir a formação de EROs, principalmente ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), as quais podem causar danos a proteínas, lipídios e DNA, caso o sistema celular de defesa antioxidante não seja capaz de neutralizar seus efeitos. A proteção celular contra os efeitos deletérios das EROs envolve um complexo sistema de defesa antioxidante composto por antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Entre as principais enzimas antioxidantes estão a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx). A SOD é uma

metaloenzima que age sobre o radical O_2^- dismutando-o a H_2O_2 . Todavia o efeito mais danoso causado pelo estresse oxidativo é a indução da peroxidação lipídica. Para a eliminação de peróxidos existem duas enzimas principais, a CAT e a GPx. A CAT tem como função dismutar o H_2O_2 em H_2O e O_2 , e está localizada em maior abundância em peroxissomos. Já a GPx está relacionada à função antioxidante do tripeptídeo glutationa, um antioxidante não enzimático (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Há um número crescente de estudos que mostram o papel dos receptores nucleares (NRs) como os principais reguladores na síntese de importantes enzimas envolvidas nas vias metabólicas de Fase I, II e III de biotransformação em mamíferos e organismos aquáticos (BAINY, 2013). Entre estes, PXR e CAR, compartilham muitos genes-alvo que codificam enzimas que modulam a formação de EROs durante suas atividades catalíticas, que incluem Fase I (ex.: CYP2A, CYP2B), Fase II (GST, SULTs) e Fase III (XIE et al., 2000; HONKAKOSKI; NEGISHI, 2000; WEI et al., 2000). A existência ou caracterização de PXR em moluscos não é conhecida. Possivelmente outros NRs estão envolvidos na indução de respostas dos CYPs em molusco, como por exemplo, PPAR e CAR (ZANETTE, 2009). A constatação da presença de sítios de ligação de estrógenos em vieiras, *Pecten magellanicus*, sugere que existem em bivalves sítios similares aos receptores de estrógeno (ERs) encontrados em mamíferos que desencadeariam possíveis efeitos da presença de desreguladores endócrinos no ambiente (WANG; CROLL, 2007).

Quando os organismos são expostos a estresse químico, parte de sua energia é gasta durante a biotransformação de xenobióticos. A capacidade de armazenar e mobilizar energia metabólica, como por exemplo, a partir dos ácidos graxos, pode ser decisiva para a produção de ATP e sobrevivência (MEDEIROS et al., 2008). Proteínas citosólicas de ligação de ácidos graxos (FABP) têm um papel importante neste processo, ligando-se reversivelmente a ácidos graxos e outros lipídios, para regular a absorção, o transporte intracelular e a compartimentalização de ácidos graxos e outros ligantes hidrofóbicos para diferentes destinos celulares (ESTEVES; EHRLICH, 2006).

Outro exemplo de biomarcador associado às respostas de defesa celular são as proteínas de choque térmico (HSPs), também denominadas proteínas de estresse. As HSPs foram originalmente identificadas pela sua expressão elevada após um choque térmico (SANDERS et al., 1991). Elas são classificadas em cinco grupos familiares com base na massa molecular da proteína (HSP100, HSP90,

HSP70, HSP60 e HSP27). As HSP's são expressas constitutivamente nas células com o propósito de manter importantes processos celulares relacionados ao dobramento de proteínas, fidelidade e translocação, agindo, primariamente, contra o efeito proteotóxico. Estressores que causem desnaturação ou dano nas proteínas, entre eles a temperatura, levariam ao recrutamento das HSPs para tal propósito, incrementando a sua síntese (HIGHTOWER, 1991). Essas proteínas são induzidas nas células em resposta a uma variedade de estressores, e garantem a sobrevivência dos organismos pela proteção das funções vitais das células (IWAKA et al., 1998). A HSP70 em especial é bem conhecida como responsiva ao estresse ambiental (CHAPMAN et al., 2011). Estudos que mediram a atividade das HSP70 em tecidos de ostras *Crassostrea gigas* (2012), *Crassostrea virginica* (CHAPMAN et al., 2011), e mexilhão *Perna perna* (KUHNEN, 2001) mostraram que sua expressão está relacionada à mudanças ambientais como hipóxia, diferenças no pH e temperatura.

1.6. Problemática da área de estudo

Apesar da grande quantidade de estudos ecológicos realizados na região do Manguezal do Itacorubi (Florianópolis, Ilha de Santa Catarina, SC) nos últimos 40 anos, esses dados são desatualizados e insuficientes (SOVERNIGO, 2009). Através da determinação e comparação das concentrações de coprostanol presentes nos sedimentos do manguezal do Itacorubi, constatou-se o impacto causado pelas atividades humanas nessa área, especialmente pela emissão de esgoto sanitário (MATER et al., 2004). Poucos estudos focaram nas consequências biológicas causadas por esse aporte crescente de contaminação potencial. Entre esses estudos, os níveis de HSP70 nas brânquias de mexilhões *Perna perna* transplantados para uma área estuarina próxima a desembocadura do manguezal, a Ponta do Lessa, foram propostos como ferramenta de monitoramento ambiental (KUHNEN, 2001). No entanto, a versatilidade reacional dessas proteínas a uma ampla faixa de estressores ambientais, demanda a utilização de outras ferramentas ou biomarcadores de forma conjunta, visando o biomonitoramento da área.

2. JUSTIFICATIVA

A aquicultura encontrou um grande potencial para seu desenvolvimento em Santa Catarina. O destaque cabe ao cultivo de ostras e mexilhões, que confere ao estado o título de maior produtor nacional desses moluscos (SOUZA FILHO, 2001). A produção total de moluscos comercializados em 2012 por Santa Catarina foi de 23.495t, representando um aumento de 28,71% em relação a 2011 (SANTOS et al., 2012). Basicamente uma atividade artesanal, o cultivo de moluscos teve um grande apelo social como uma solução para comunidades locais que viviam da pesca, tornando-se um atrativo turístico e cultural (FERREIRA; OLIVEIRA NETO, 2006).

O cultivo de moluscos (maricultura), assim como a aquicultura de uma maneira geral, dependem fundamentalmente dos ecossistemas nos quais estão inseridos. Diz-se que a aquicultura moderna está calcada em três pilares: a produção lucrativa, a preservação do meio ambiente e o desenvolvimento social (VALENTI, 2002). Assim sendo, fica evidente a interdependência da maricultura, do turismo e da qualidade ambiental, como parte da identidade de Florianópolis.

Florianópolis é um destino turístico conhecido internacionalmente principalmente pelas suas belezas naturais, aliadas ao apelo cultural; características essas que, por sua vez, são sub aproveitadas. A sazonalidade, os problemas de infraestrutura e a falta de ações concretas dos governantes são grandes entraves no desenvolvimento do turismo de forma sustentável. Enquanto o turismo permanece estagnado, Florianópolis aparece constantemente na mídia como a capital com a melhor qualidade de vida, atraindo pessoas de todas as partes do país. Com um crescimento demográfico acelerado nas últimas décadas, a cidade passou de 187.871 habitantes em 1980 para 421.240 em 2010, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010).

O crescimento desenfreado no espaço limitado da Ilha de Santa Catarina tem causado consequências desastrosas a seus ecossistemas, tal como o que ocorre na Bacia Hidrográfica do Itacorubi, que deságua no Manguezal do Itacorubi (SOVERNIGO, 2009). Área de crescimento preferencial no século XX, já sofreu inúmeros aterros para a implantação e ampliação de estradas e de residências. De 1958 a 1990 todos os resíduos sólidos produzidos pela cidade de Florianópolis eram depositados no “lixão do Itacorubi” aterro que ficava as margens do manguezal. Ainda hoje, essa bacia possui vários problemas a serem solucionados, como deficiências no sistema viário da região,

contaminação por esgotos domésticos e industriais, insuficiência nas coletas de lixo, rede de abastecimento público de qualidade dúbia, moradias irregulares em áreas de proteção ambiental (APPs), alagamentos em áreas mais baixas, subaproveitamento de nascentes para abastecimento local, entre outros (PMF, 2000). Mais recentemente foi instalado o Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON), maior hospital do estado de Santa Catarina na área do câncer.

Eventualmente, o Manguezal do Itacorubi, é o sumidouro de toda essa descarga de efluentes. Por ser um ecossistema extremamente frágil e importante, faz-se necessário o seu monitoramento a fim de se entender a amplitude das possíveis alterações sofridas, devido principalmente ao aumento no aporte de matéria orgânica, metais traço, disruptores endócrinos, e outros contaminantes.

Os efeitos biológicos em uma espécie modelo, associados aos danos ou impactos na qualidade ambiental causados pela presença de contaminantes, poderiam ser utilizados como ferramenta de monitoramento ambiental, subsidiando a avaliação da eficiência de estratégias de preservação da qualidade ambiental e da biodiversidade.

O presente estudo foi financiado com recursos do CNPq, oriundos do edital específico para os Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia, a partir do qual foi estabelecido o INCT em Toxicologia Aquática (INCT-TA), do âmbito do qual o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI) participa. Os resultados aqui apresentados serão preparados para submissão no periódico *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi validar genes transcritos diferencialmente em ostras do mangue, *Crassostrea brasiliana*, como biomarcadores moleculares responsivos à contaminação por esgoto sanitário.

3.2. Objetivos Específicos

- Quantificar os níveis dos transcritos de genes alvo em brânquias de ostras *C. brasiliana* expostas *in situ* em uma área do manguezal do Itacorubi, em Florianópolis, SC, considerada *a priori* contaminada por esgoto sanitário, e comparar com o local referência;
- Caracterizar os locais de exposição e o referência através da análise de contaminantes orgânicos presentes no sedimento e no tecido dos animais expostos;
- Comparar os resultados obtidos entre os diferentes períodos do ano: novembro de 2011, início do verão, e abril de 2012, após o término da temporada de verão;
- Avaliar o potencial da utilização dos genes alvo selecionados como possíveis biomarcadores moleculares em *C. brasiliana* e como ferramentas ecotoxicológicas no biomonitoramento de manguezais e ambientes estuarinos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Área de estudo e desenho experimental

O Manguezal do Itacorubi (Figura 2), um manguezal do tipo bosque misto de bacia (SORIANO-SIERRA et al., 1998), situado entre as coordenadas 27°34'14'' - 27°35'31'' S e 48°30'07'' - 48°31'33'' W, localiza-se no Centro-Oeste da Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil, na área estuarina da Bacia Hidrográfica do Itacorubi, que possui 2844,6ha de acordo com Vieira (2007), e é alimentado pelos rios Itacorubi e Sertão, com extensões totais de 8,1km e 5,9km, sendo que desse total, respectivamente, 3,27km e 2,2km estão dentro da área do manguezal (SÁNCHEZ DALOTTO, 2003).

Neste estudo, balsas de monitoramento foram instaladas em dois locais, um a montante (ITAI 27°34'40"S 48°30'59"W) no rio Itacorubi e outro a jusante (ITAI 27°34'35"S 48°31'9"W) na convergência dos dois rios. Uma terceira balsa foi instalada em um local no Manguezal do Ratores (RAT 27°28'17"S 48°31'17"W), ao norte da Ilha de Santa Catarina considerada como área referência no presente estudo. O Manguezal do ratones está em sua totalidade localizado dentro da Estação Ecológica de Carijós criada através do Decreto Presidencial no. 94.656 em 20 de julho de 1987, ela é administrada desde então ICMBIO e é considerada como uma área pristina.

O ponto de exposição ITAI, localizado na desembocadura do Rio Itacorubi, provavelmente recebe uma maior carga de esgoto sanitário. Ele é o rio mais extenso e corta os Bairros do Itacorubi, Santa Mônica e Córrego Grande, além de receber grandes quantidades de efluentes já em suas nascentes, onde estão localizadas as comunidades mais carentes, o Morro do Quilombo e do Poção do Córrego Grande. O Rio Itacorubi ainda cruza os loteamentos do Jardim Anchieta e Parque São Jorge e recebe efluentes da Universidade Estadual de Santa Catarina. O Ponto ITAI, mais a jusante, recebe também influência do Rio Sertão. Este, por sua vez, passa ao lado do Shopping Center Iguatemi e recebe efluentes da Universidade Federal de Santa Catarina, do Hospital Universitário, e pequenos córregos que descem dos morros da região.

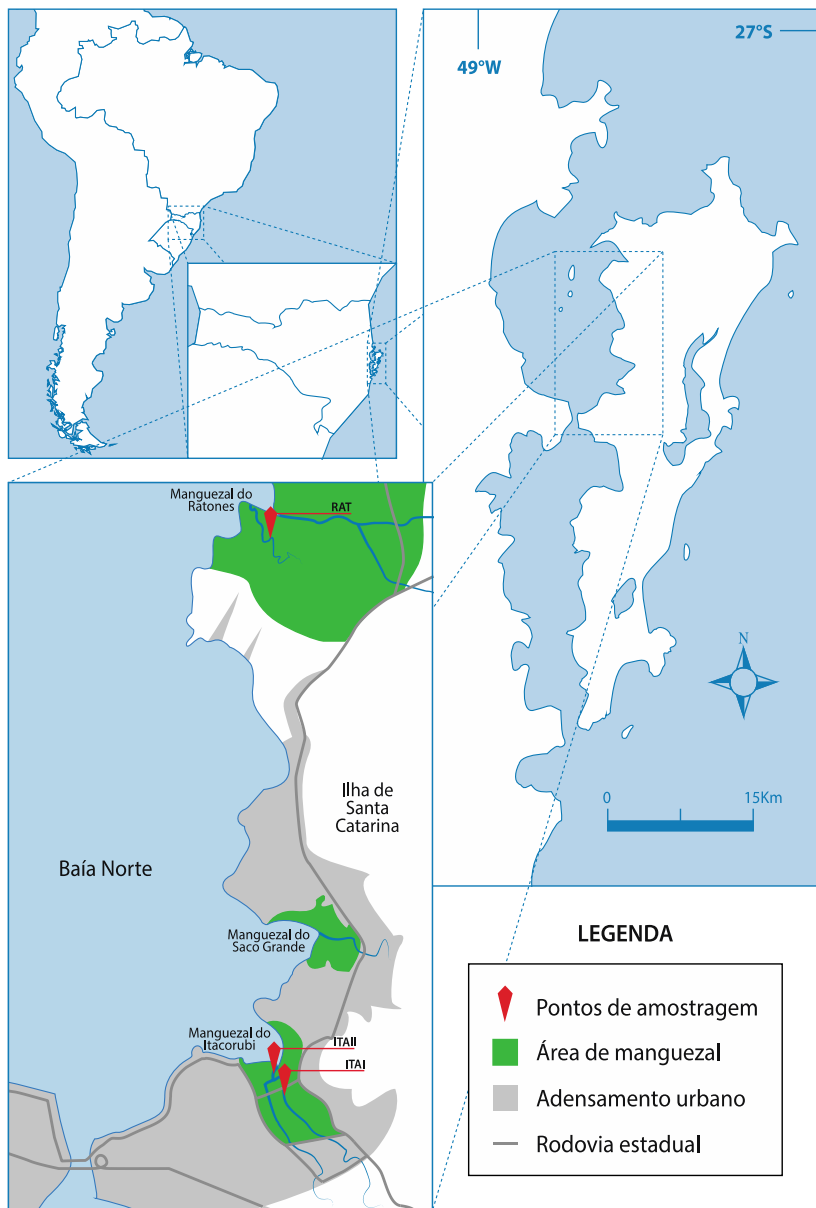


FIGURA 2 - Mapa de localização dos pontos de amostragem, onde foram instaladas as balsas de monitoramento ambiental.

As ostras foram acondicionadas em travesseiros, que permaneceram submersos a 10cm da superfície, acoplados às balsas de monitoramento amarradas a poitas de concreto. Exemplos de *C. brasiliensis* de um mesmo lote, com comprimento total entre 5 e 8 cm, foram obtidas na estação de cultivo experimental do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), na Praia de Sambaqui, Florianópolis, SC. Os animais foram previamente aclimatados por dez dias em aquários de 40 litros aerados, com renovação de água diária e alimentados com microalga liofilizadas. As condições foram controladas com a finalidade de reduzir gradativamente a salinidade até 18ppt, tendo em vista a exposição *in situ*.

A Figura 3 mostra como foram instaladas as balsas de monitoramento.



FIGURA 3 – Instalação das balsas de monitoramento.

4.2. Preparação das amostras

Amostras de brânquia de seis animais da exposição pré-verão (EXP1), e doze animais da exposição pós-verão (EXP2) de cada um dos locais da exposição *in situ* (ITAI e ITAII) e do local referência (RAT)

foram coletadas 24 e 96 horas após a exposição. O tecido foi armazenado em tubos Eppendorf® de 1,5mL embebidos em reagente para conservação de RNA (RNA Later), e armazenados em freezer -80°C para posterior extração de RNA.

4.2.1. Extração de RNA total

A extração de RNA total (RNAt) das brânquias foi realizada com o reagente Total RNA Isolation Reagent TRIR (Thermo Scientific®), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Resumidamente, as amostras foram retiradas do freezer -80°C, 200mg de tecido de cada indivíduo da exposição pré-verão (EXP1) e de um “pool” de dois indivíduos da exposição pós-verão (EXP2) foram maceradas em 1mL de reagente TRIR com o auxílio de um rotor Tissue Tearor™ modelo 985370 (Biospec Products, Inc.). Após uma hora de incubação a temperatura ambiente, foram adicionados 200µl de clorofórmio, seguidos de agitação vigorosamente por 15seg e incubado por mais 3min. Duas fases foram visíveis após centrifugação (1400g, 4°C, 30min). A fase superior, hidrofílica, contendo o RNA, foi transferida para um novo eppendorf pré-refrigerado. O RNA, que é solúvel em água mas não em álcool, precipita com a adição de 500µl de isopropanol gelado. Após incubação e uma nova centrifugação (1400g, 4°C, 40min), o precipitado foi lavado com 1mL de etanol 75% gelado, seguido por uma nova centrifugação (7500g, 4°C, 5min). O sobrenadante foi removido, o precipitado foi seco e ressuspensionado em água (para biologia molecular). A concentração de ácidos nucleicos foi medida pela absorbância a 260nm e a pureza do RNA total de acordo com a razão da absorbância em 260nm e em 280nm, através de um espectrofotômetro NanoDrop 2000 da Thermo Scientific. As amostras de RNA foram diluídas em água para biologia molecular a uma concentração final de 500µg, e armazenados em um freezer -80°C.

4.2.2. Síntese do cDNA

A transcrição reversa para síntese de cDNA foi realizada a partir de 1µg de RNA total, utilizando o *kit* QuantiTect® Reverse Transcription (QIAGEN) de acordo com o protocolo do fabricante. Na primeira etapa, que constitui na eliminação de DNA genômico, 2 µl de amostra de RNA foram incubadas com 10µl de água livre de RNase e 2µl de “gDNA Wipeout Buffer” fornecido pelo *kit*. Na segunda etapa, um volume de 14µl de amostra de RNA (livre de DNA genômico) foram

adicionados a uma mistura contendo: 1µl de Quantiscript Reverse Transcriptase, 4µl de Quantiscript RT Buffer e 1µl de RT Primer Mix; totalizando 20µl. Cada amostra de cDNA foi alíquotada em tubos com 5µl e armazenadas para uso posterior.

4.3. PCR em tempo real (*qPCR*)

A análise dos níveis de transcritos dos genes selecionados como genes alvo foi realizada através de PCR em tempo real (*qPCR*).

4.3.1. Desenho de iniciadores (“*Primers*”)

Os iniciadores para as reações de *qPCR* foram desenhados com base nas sequências obtidas no transcriptoma da *C. brasiliensis* (LÜCHMANN, 2012), utilizando a ferramenta Primer Quest (<http://www.idtdna.com/Primerquest>). A partir da lista de iniciadores desenhados, foram selecionados os mais adequados para nossas condições com o auxílio da ferramenta Oligo Analyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer>), considerando a temperatura de “*melting*”, conteúdo de GC, tamanho do *amplicon* a ser gerado, e formação de estruturas secundárias. A Tabela 1 mostra a lista dos Iniciadores, a respectiva sequência de nucleotídeos e o tamanho do produto esperado.

TABELA 1 - Iniciadores para os genes de *C. brasiliensis* que foram utilizadas nas reações de qPCR, e os tamanhos de produtos esperados.

Nome do gene	Sequência dos iniciadores 5' - 3' (<i>forward e reverse</i>)	Tamanho amplicon (pb)
<i>28S Ribosomal-like</i>	CCC GAA GCC AAA CAC ATT CAA GTG G GGC TTT CCA TTG CGG TCA CCT TAG	131
<i>α-tubulina-like</i>	TGA GGC CCG TGA AGA TCT TGC TGC ACC ACC CTC CTC TTC AGC TTC ACC T	145
<i>β-tubulina-like</i>	GGG CTA AGG GAC ACT ACA CAG AAG GAG C TGT TCC CAT ACC AGA TCC GGT GCC A	146
<i>Catalase-like</i>	TAC AAC CAC ATC GAG GAC GGG AAG TCC TTC TGG GAC CAT ACC TTG GTG	151
<i>SOD-like</i>	GCT CCA GAG GAT ACT GAG AGG CAT CCA ATG ATG GAT TGA GGA CCA GCA	124
<i>GPx-like</i>	CGT TGC CGC CAT TGA CCT CTA TCT ACC AGT TTG GAA GTC AGG AGC CAG	144
<i>CYP2AU1</i>	AAC GGC AAG AGG TGT AAG GTT TGC TAA TCC ATC ACC CGG ATT GGC AGA	158
<i>CYP2B-like</i>	CGC TTC GCA GTC CAA GTT GAC AAA ATC GTG TTT GGG TTC AGG TAT GCG	136
<i>GSTômega-like</i>	ATT GGC ACA CGT ACC TCG \CT GAT TTA ATG GGA CCG CCA GAA GGT CAT	175
<i>GSTmicrosomal3-like</i>	GCA TTG TCT GGT GTG GTT TGG TGT CCT GAG AGT ATG ATG CAG CTT GCA GA	153
<i>Sulfotransferase1C1-like</i>	CAC CTG TTA CCT CGC CAT ACT CCA ACT ACC ATG TCC TTC ATC AGG TCC C	149
<i>FABP-like</i>	ACG TGA ACG ACG ATG ACC ACA AGT TGG TGT TGT CCT TGG ATT TAC CGT CC	105
<i>ALAd-like</i>	GCC ACC AGT AAA TCA GGA AAC CAG C CAG GTA TGG CAT CAA CAG GCT GAG	192
<i>HSP70-like</i>	CAC CAT AGG CAA CAG CTT CAT C GAC AAG GGT CAG ATC CAC GAT A	108

4.3.2. Padronização das condições de *qPCR*

Para a obtenção dos níveis de eficiência recomendados para a análise por *qPCR* para cada corrida foram utilizadas curvas de concentração com um “pool” de todas as amostras, como determina Bustin et al. (2009). As reações de *qPCR* foram realizadas em duplicata em um volume total de 20 μ L, utilizando o *kit* QuantiFast SYBR Green PCR (QIAGEN) em um termociclador Rotor-Gene TM 6000 (QIAGEN). Em cada corrida foi analisada a transcrição de determinado gene nas amostras dos diferentes tratamentos em cada tempo (24 e 96 horas), sendo, ao final da reação, obtida a curva de fusão (ou *melting*) para a verificação da existência de um único produto de amplificação em cada reação. A Tabela 2 mostra as condições programadas no termociclador.

TABELA 2 - O programa utilizado nas reações de *qPCR*.

Passo	Tempo	Temperatura	Comentário
Ativação Inicial	5 min	95°C	HotStarTaq <i>Plus</i> é ativada
Segundo Passo (Ciclo)			
Desnaturação	10 s	95°C	
Anelamento e extensão	30 s	60°C	Dados de fluorescência são coletados
Número de ciclos	35-40		Depende da quantidade de RNA da amostra

4.3.3. Análise dos resultados

O método do delta CT é um dos mais populares na determinação das diferenças de concentrações nas amostras analisadas por *qPCR*. O método é baseado na normalização a um gene referência (BUSTIN et al., 2009).

Para a análise comparativa, o ΔC_T foi obtido através da diferença do valor referente ao ciclo de quantificação (ou “*threshold cycle*”) entre o gene alvo e genes referência. O uso de um único gene referência como normalizador pode ser aceito no caso de evidência clara de que este não varia o seu nível de transcrição quando submetido às condições experimentais (BUSTIN et al., 2009). Para aumentar a confiabilidade de nossas reações de *qPCR*, dois genes considerados potencialmente como prováveis genes constitutivos foram utilizados como normalizadores para o cálculo da transcrição diferencial entre os grupos. Utilizamos o *ribossomal 28S-like* e *β -tubulina-like* como normalizador para as

amostras de 24h de exposição, e *ribossomal 28S-like* e *α -tubulina-like* para as amostras de 96h de exposição.

4.4. Parâmetros ambientais

Um multiparâmetro portátil da marca YSI modelo 556 MPS foi utilizado para medir oxigênio dissolvido, saturação de oxigênio, salinidade, pH e temperatura da água no tempo zero e nos momentos das coletas (24h e 96h). Um disco de Secchi foi utilizado para medir a transparência da água. Amostras de água também foram coletadas para análises de outros parâmetros de qualidade como clorofila e nutrientes inorgânicos dissolvidos (nitrato, nitrito, nitrogênio amoniacal e fosfato). Essas análises serão realizadas junto ao Laboratório de Biogeoquímica Marinha da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As análises de parâmetros microbiológicos (coliformes totais e fecais), assim como a demanda bioquímica do oxigênio (DBO), foram terceirizadas, sendo realizadas pela empresa QMC Saneamento Ltda. A Figura 4 mostra o artefato utilizado na coleta das amostras de água.



FIGURA 4 – Artefato utilizado para a coleta das amostras de água.

Para verificar uma possível bioacumulação nos animais expostos, bem como a caracterização dos locais monitorados, ostras (10 animais) e sedimento (250g) foram coletados no início e no final da exposição para a realização de análises de contaminantes orgânicos (pesticidas organoclorados, bifenilas policlorados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e alquilbenzeno lineares) e análises de metais (cromo, chumbo, manganês, zinco, cobre e mercúrio). Estas análises foram realizadas em parceria com o Laboratório de Química Orgânica do Instituto Oceanográfico, da Universidade de São Paulo (USP), e Laboratório de Hidroquímica, da Universidade Federal de Rio Grande (FURG), respectivamente.

4.5. Análise estatística

O programa GraphPad Prism 5.0 para Mac OS X (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA) foi utilizado na análise estatística dos dados de transcrição gênica. Os dados foram submetidos à análise ANOVA e pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). A homocedasticidade foi testada pelo teste de Bartlett, quando os dados não apresentaram homocedasticidade foram submetidos a uma transformação logarítmica.

5. RESULTADOS

Os parâmetros ambientais da água verificados no momento da exposição (tempo 0h) e das coletas (tempo 24h e 96h) são mostrados na Tabela 3. A temperatura média da água na exposição pré-verão (novembro de 2012) foi de 24,76°C ($\pm 1,14$), enquanto na exposição pós-verão (abril de 2013) foi de 24,17°C ($\pm 0,76$). A salinidade e transparência são parâmetros bastante influenciados pela maré, porém numa visão geral verificou-se os maiores valores de transparência em RAT comparando a ITAI e ITAII, especialmente no experimento pré-verão, onde a transparência média em RAT foi de 86cm comparado a 58cm nos pontos de exposição. Entre os grupos expostos, a transparência em ITAII foi maior e no experimento pós-verão foi muito próximo aos valores de RAT.

TABELA 3 - Os parâmetros ambientais no exato momento da coleta em cada ponto de amostragem, indicando os valores de temperatura da água, salinidade, oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio, saturação de oxigênio, transparência, condutividade e pH.

Tempo	0h			24h			96h		
NOV 2012	RAT	ITAI	ITAII	RAT	ITAI	ITAII	RAT	ITAI	ITAII
Temp. (°C)	25	25,7	25,8	25,5	25,9	25,2	23,3	23,3	23,3
Salinid. (ppt)	25,2	25,4	19,7	17,9	27,9	26,3	35,4	35,7	35,7
OD (mg/mL)	3,2	2,5	1,5	1,6	2,1	2,1	6,0	6,0	5,7
DBO (mg/L)	<2,0	2,9	4,1	<2,0	<2,0	3,7	<2,0	<2,0	<2,0
Saturação (%)	46,8	35	21	21,3	28,1	30,2	86,3	87,4	81,6
Transp. (cm)	70	68	78	100	68	70	88	29	34
Cond. (mS/m)	46,7	40,3	31,8	29	30,8	30,2	53,6	54	54
pH	7,5	7,5	7,4	7,3	7,3	7,2	7,7	8,1	8,1
ABRIL 2013	RAT	ITAI	ITAII	RAT	ITAI	ITAII	RAT	ITAI	ITAII
T°C	24,4	23,6	24,2	24,7	23,4	24	25,8	23,6	23,7
Salinid. (ppt)	34,9	34,9	35,4	31,6	21	22,5	36,3	19,5	20
OD (mg/mL)	6,5	4,7	6,8	5,6	0,3	0,8	7,4	0,9	0,6
DBO (mg/L)	<2,0	5	4	<2,0	5	5	3	8	5
Saturação (%)	94	67,1	97,6	80,7	4,4	12,3	11,2	13,5	6,7
Transp. (cm)	75	67	75	60	50	60	58	50	56
Cond. (mS/m)	52,9	51,2	52,1	48,1	34,2	36,3	30,4	33,0	54,8
pH	7,9	7,8	8,1	7,3	7,9	7,7	8,2	7,4	7,6

Oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e saturação de oxigênio, também são parâmetros bastante

influenciados pela variação da maré. No entanto, é possível ver uma tendência nos maiores valores de DBO nos grupos expostos, especialmente no experimento pós-verão (Figura 6). Os menores valores de transparência e saturação, associados aos maiores valores de DBO, são decorrentes da grande quantidade de matéria orgânica nos pontos de exposição, ainda mais evidente no experimento pós-verão.

A análise de contaminantes orgânicos no tecido dos animais mostrou valores abaixo do nível de detecção ou muito próximo para PCBs em todas as amostras e HPAs nas amostras coletadas na exposição pós-verão (dados não mostrados). Os níveis de HPAs nos tecidos dos animais na exposição pré-verão foram superiores nos grupos expostos e estão na Tabela 4. Por outro lado, LABs foram detectados em todas as amostras de tecido (0h, 24h e 96h) nas duas exposições (pré e pós-verão) e a média da \sum LABs totais foi de 232,09 ng.g⁻¹ de peso seco ($\pm 117,48$), porém não foram observados valores críticos ou que caracterizassem uma bioacumulação nos animais expostos.

TABELA 4 – Valores de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) nas ostras na exposição pré-verão em ng.g⁻¹ de peso seco. *Relação HPAs leves com 2 e 3 anéis aromáticos por HPAs pesados com 4, 5 e 6 anéis aromáticos. n.c. = não calculado. <ldm = abaixo do limite de detecção.

Tempo	0h	24h			96h		
		RAT	ITAI	ITAI	RAT	ITAI	ITAI
trimetilnaftaleno	<7,27	<7,27	<7,27	<7,27	<7,27	36,72	33,1
fenantreno	3,69	6,93	12,59	11,55	<3,48	18,02	21,63
antraceno	<3,46	<3,46	<3,46	<3,46	<3,46	<3,46	<3,46
dimetilfluoreno	<10,3	<10,3	<10,3	<10,3	<10,3	<10,3	<10,3
metildibenzotiofeno	<2,81	<2,81	<2,81	<2,81	<2,81	18,86	<2,81
metilfenantreno	<5,85	<5,85	<5,85	<5,85	<5,85	16,99	<5,85
dimetildibenzotiofeno	<2,81	<2,81	<2,81	<2,81	<2,81	<2,81	<2,81
dimetilfenantreno	<5,85	<5,85	<5,85	<5,85	<5,85	6,78	<5,85
fluoranteno	3,39	<2,63	<2,63	4,49	<2,63	4,22	16,14
pireno	<2,45	<2,45	<2,45	4,38	<2,45	2,77	7,77
criseno	<3,52	<3,52	<3,52	<3,52	<3,52	<3,52	8,82
HPAs totais	7,08	6,93	12,59	20,42	<1,14	104,36	87,46
HPAs leves	3,69	6,93	12,59	15,93	<1,41	100,14	62,5
HPAs pesados	3,39	<1,14	<1,14	4,49	<1,14	4,22	24,96
Relação leves/pesados*	1,09	n.c.	n.c.	3,55	n.c.	23,73	2,50

As amostras de sedimento coletadas ao final das duas exposições mostraram níveis de HPAs e LABs nos pontos de exposição (ITAI e ITAI) superiores ao ponto referência (RAT), o que mostra o aporte desses contaminantes e a degradação da área de estudo, Tabela 5.

TABELA 5 – Valores encontrados no sedimento ao final de cada exposição para Bifenilas Policloradas (PCBs), Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) e Alquilbenzeno Lineares (LABs) em ng.g^{-1} de peso seco. *Relação HPAs leves com 2 e 3 anéis aromáticos por HPAs pesados com 4, 5 e 6 anéis aromáticos. **Relação da soma dos isômeros internos pelos externos de C12 LAB. n.c. = não calculado.

Exposição	pré-verão (novembro 2011)			pós-verão (abril de 2012)		
	RAT	ITAI	ITAI	RAT	ITAI	ITAI
PCBs						
PCBs totais	<0,51	<0,51	<0,51	<0,51	<0,51	<0,51
HPAs						
HPAs leves	<1,10	30,84	57,68	<1,10	23,1	3,6
HPAs pesados	<1,00	76,07	95,68	<1,00	91,70	55,52
HPAs totais	<1,00	108,13	154,85	<1,00	142	76,2
Relação leves/pesados	n.c.	0,41	0,60	n.c.	0,3	0,1
LABs						
Σ C10 LAB	<1,68	25,27	16,69	<1,68	20,2	21,87
Σ C11 LAB	<0,85	88,43	64,08	<0,85	82,93	76,42
Σ C12 LAB	<0,99	155,78	120,02	<0,99	156,83	130
Σ C13 LAB	<1,31	220,38	173,17	<1,31	231	176,69
Σ C14 LAB	<0,85	6,67	5,31	<0,85	9,64	4,28
Σ LABs totais	<0,85	496,53	379,27	<0,85	500,6	409,26
Relação I/E*	n.c.	2,19	2,75	n.c.	2,23	1,95

As Figuras 5 e 6 mostram a amplitude da maré ao longo dos dias de exposição, pré-verão e pós-verão respectivamente, e os parâmetros ambientais no exato momento da coleta em cada ponto de amostragem (RAT, ITAI e ITAI). Segundo INMET (2013), durante o experimento pós-verão não houve nenhuma precipitação acumulada durante a exposição, no entanto foi registrada no experimento pré-verão uma precipitação acumulada de 3,2mm entre o tempo 0 e 24h de exposição. Um segundo evento de chuva ocorreu entre 24 e 48h, registrando somente 1,1mm de precipitação acumulada, mas não houve nenhuma precipitação acumulada nas 24h que antecederam a coleta de 96h.

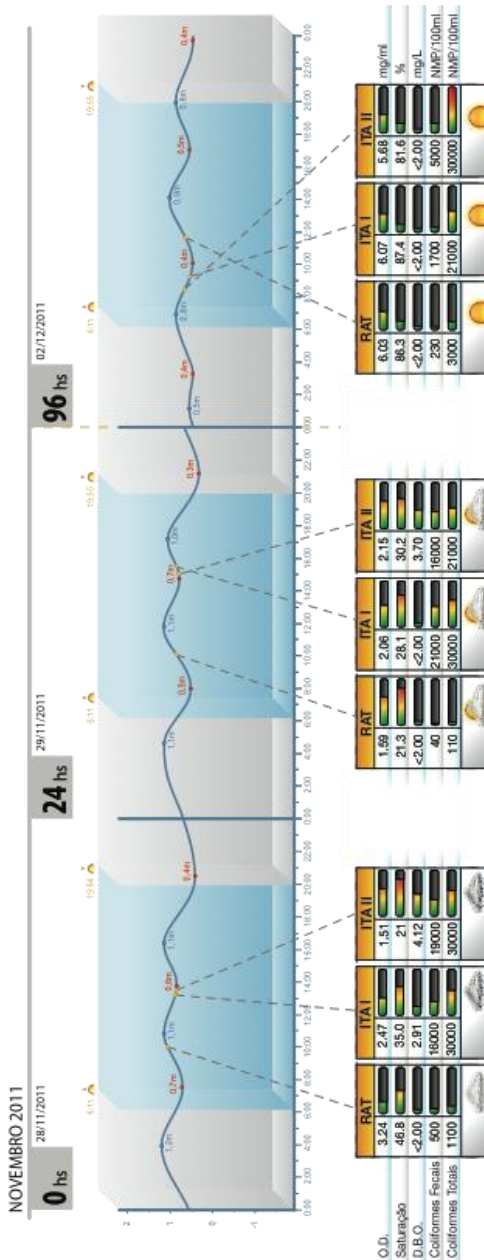


FIGURA 5 - O esquema mostra a amplitude da maré ao longo dos dias durante a exposição pré-verão, e os respectivos parâmetros ambientais no exato momento da coleta em cada ponto de amostragem (RAT, ITA I e ITA II). As tabelas indicam os valores de oxigênio dissolvido (O.D.), porcentagem de saturação de oxigênio (Saturação), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), coliformes fecais e totais, e precipitação acumulada nas últimas 24h de exposição. As barras coloridas indicam o estado de depleção do ambiente, onde verde é considerado pouco, amarelo médio e vermelho altamente impactado, para cada parâmetro ambiental. O.D. (0 - 10 mg/mL), onde quanto menor o valor maior a depleção; Saturação (0-100%), D.B.O (<2 - 10 mg/mL), Coliformes Fecais e Coliformes Totais (0 - 300000 NMP/100mL), onde os maiores valores indicam maior depleção.

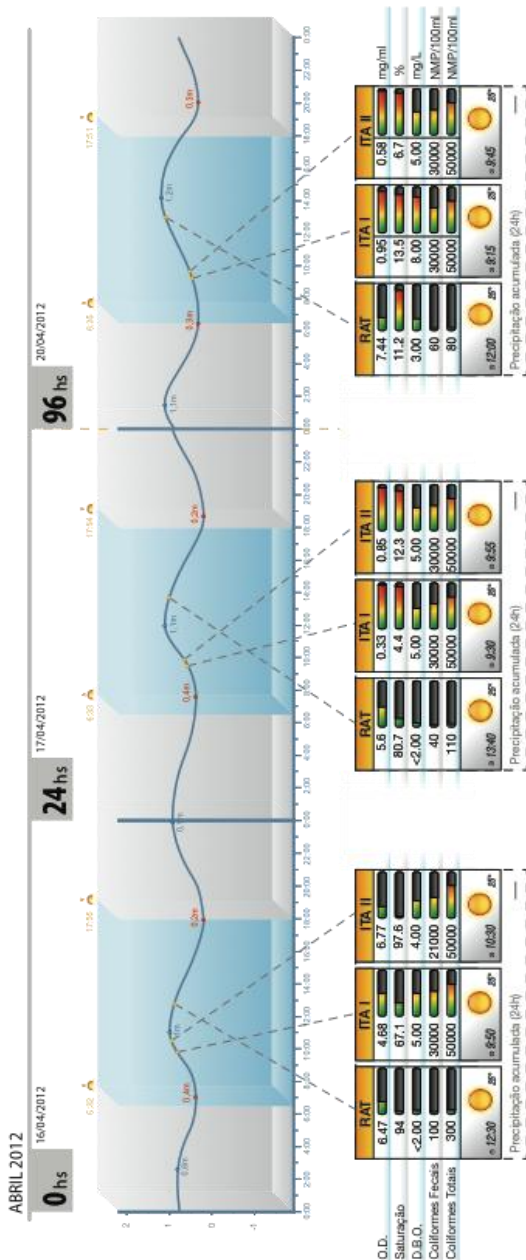


FIGURA 6 - O esquema mostra a amplitude da maré ao longo dos dias durante a exposição pós-verão, e os respectivos parâmetros ambientais no exato momento da coleta em cada ponto de amostragem (RAT, ITA I e ITA II). As tabelas indicam os valores de oxigênio dissolvido (O.D.), porcentagem de saturação de oxigênio (Saturação), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), coliformes fecais e totais, e precipitação acumulada nas últimas 24h de exposição. As barras coloridas indicam o estado de depleção do ambiente, onde verde é considerado pouco, amarelo médio e vermelho altamente impactado, para cada parâmetro ambiental. O.D. (0 - 10 mg/mL), onde quanto menor o valor maior a depleção; Saturação (0-100%), D.B.O (<2 - 10 mg/mL), Coliformes Fecais e Coliformes Totais (0 - 300000 NMP/100mL), onde os maiores valores indicam maior depleção.

Os níveis de transcritos de *FABP*-like (*FABP*) nas brânquias dos animais expostos foram superiores no grupo ITAI em 24h em relação ao grupo referência (RAT), seguindo o mesmo padrão de transcrição nas duas exposições porém com uma nível de transcrição expressivo na exposição pré-verão. Enquanto em ITAII, apesar de uma tendência, os níveis não foram estatisticamente superiores a RAT e nem diferentes de ITAI. Em 96h, enquanto na exposição pré-verão observou-se uma alternância, onde ITAII passou a ser mais expresso que o grupo referência e ITAI não foi diferente estatisticamente, na exposição pós-verão tanto ITAI manteve, quanto ITAII passou a ter níveis de transcritos superiores a RAT (Figura 7).

Com um comportamento similar ao observado para a *FABP*, os níveis de transcritos *Sulfotransferase1C1-like* (*SULT*) em 24h de exposição em ITAI foram superiores a RAT, porém para esse gene ITAII também foi superior estatisticamente em relação ao grupo referência. Apesar de níveis menores de transcrição, foi também constatado um nível expressivo de transcrição em 24h na exposição pré-verão. Numa visão geral, os maiores valores foram constatados nos grupos que tiveram os maiores níveis de transcritos de *FABP*, porém em 96h não foram observadas diferenças significativas na exposição pré-verão, enquanto na exposição pós-verão, os grupos expostos foram superiores ao referência, e ITAI superior a ITAII (Figura 8).

Os genes que codificam para as CYPs (*CYP2A1* e *CYP2B-like*), apresentaram o mesmo padrão de expressão e também tiveram uma transcrição bem acentuada nos grupos expostos em 24h nas duas exposições. Enquanto na exposição pré-verão ITAI e ITAII não foram significativamente diferentes, na exposição pós-verão os níveis de transcritos de ITAI foram superiores a ITAII. Comparando as duas isoformas de CYPs no tempo de 24h, *CYP2B-like* teve os maiores níveis de transcritos na exposição pré-verão, já *CYP2A1* teve os maiores valores na exposição pós-verão. Verificou-se que após uma expressão elevada em 24h os níveis de transcritos voltaram a valores basais em 96h ou até mesmo abaixo do grupo referência (*CYP2B-like* na exposição pré-verão), momento em que houve uma alternância com os maiores valores para ITAII (Figura 9).

A transcrição do gene *ALAd-like* (*ALAd*) foi reprimida nos grupos expostos apenas em 96h na exposição pré-verão, curiosamente no mesmo momento que foi observada uma repressão de *CYP2B-like*. Em todos outros momentos não houve diferença significativa nos níveis de transcritos dos grupos expostos em relação ao grupo referência (Figura 10).

Outro gene que foi reprimido nos grupos expostos foi a *GSTmicroosomal-like* (*GSTm*). Isto ocorreu apenas na exposição pré-verão, porém nos dois tempos (24h e 96h). Por outro lado, os níveis de transcritos *GSTômega-like* (*GST Ω*) foram superiores em todos os momentos nas duas exposições, com exceção do tempo 96h na exposição pré-verão (Figura 10).

Foi observada uma leve tendência no aumento na transcrição do gene *HSP70-like* (*HSP70*) nos grupos expostos. Na exposição pré-verão em 24h, ITAII foi estatisticamente diferente de ITAI e RAT, enquanto em 96h ITAII teve níveis de transcritos maiores que de RAT, mas não foi estatisticamente diferente de ITAI. Já na exposição pós-verão, os grupos expostos (ITAI e ITAII) foram estatisticamente diferentes de RAT apenas em 24h de exposição (Figura 9).

Os níveis de transcritos do gene *Catalase-like* (CAT) foram superiores apenas em ITAII em 24h na exposição pré-verão, em todos os outros momentos não foram observadas diferenças nos níveis de transcritos entre os grupos expostos e o controle. Por outro lado, análise dos níveis de transcritos da *SOD-like* (SOD) e *GPx-like* (GPx) não mostraram diferenças estatísticas em nenhum momento das exposições (Figura 11).

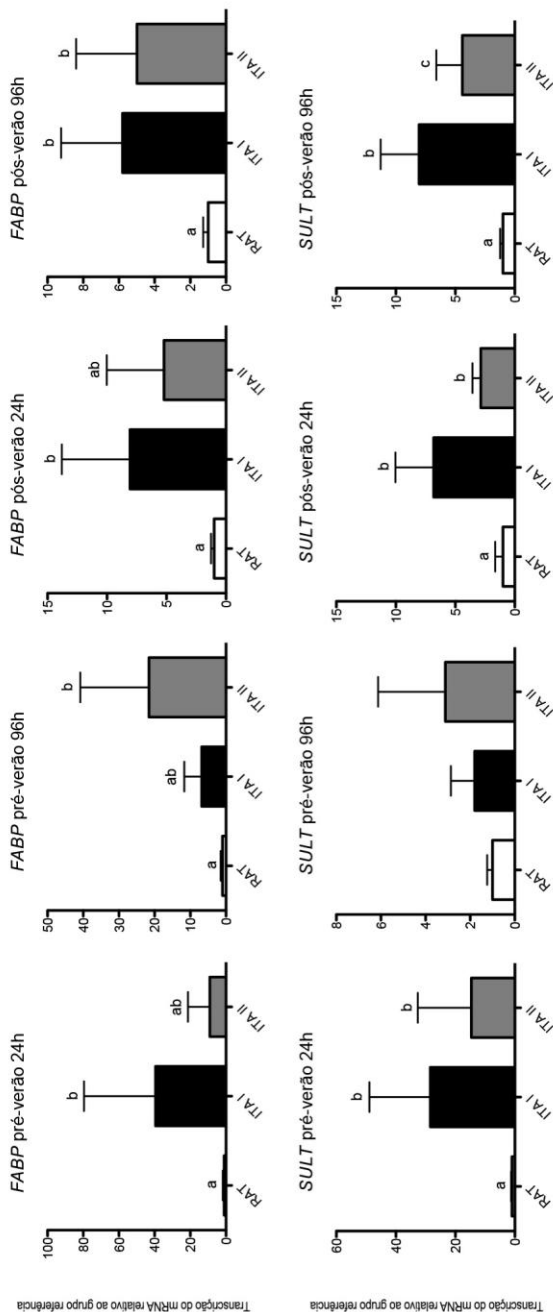


FIGURA 7 – Níveis de transcritos relativos dos genes putativos de *FABP-like* (*FABP*) e *SulfotransferaseIC1-like* (*SULT*) em 24h e 96h de exposição, nos experimentos pré-verão e pós-verão. Os níveis de transcritos foram avaliados por *qPCR* e a transcrição nos grupos expostos (ITAI e ITAII) é relativa ao grupo referência (RAT). Letras representam diferenças nos níveis de transcritos ($p < 0.05$).

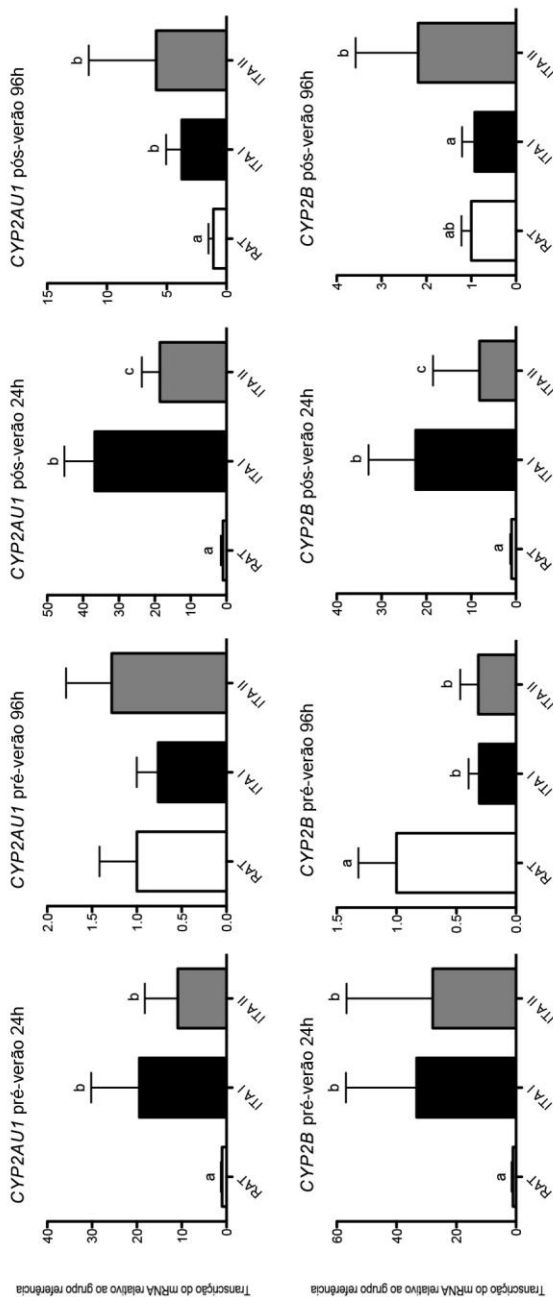


FIGURA 8 – Níveis de transcritos relativos dos genes putativos de *CYP2AU1* e *CYP2B-like* (*CYP2B*) em 24h e 96h de exposição, nos experimentos pré-verão e pós-verão. Os níveis de transcritos foram avaliados por qPCR e a transcrição nos grupos expostos (ITAII e ITAI) é relativa ao grupo referência (RAT). Letras representam diferenças nos níveis de transcritos ($p < 0,05$).

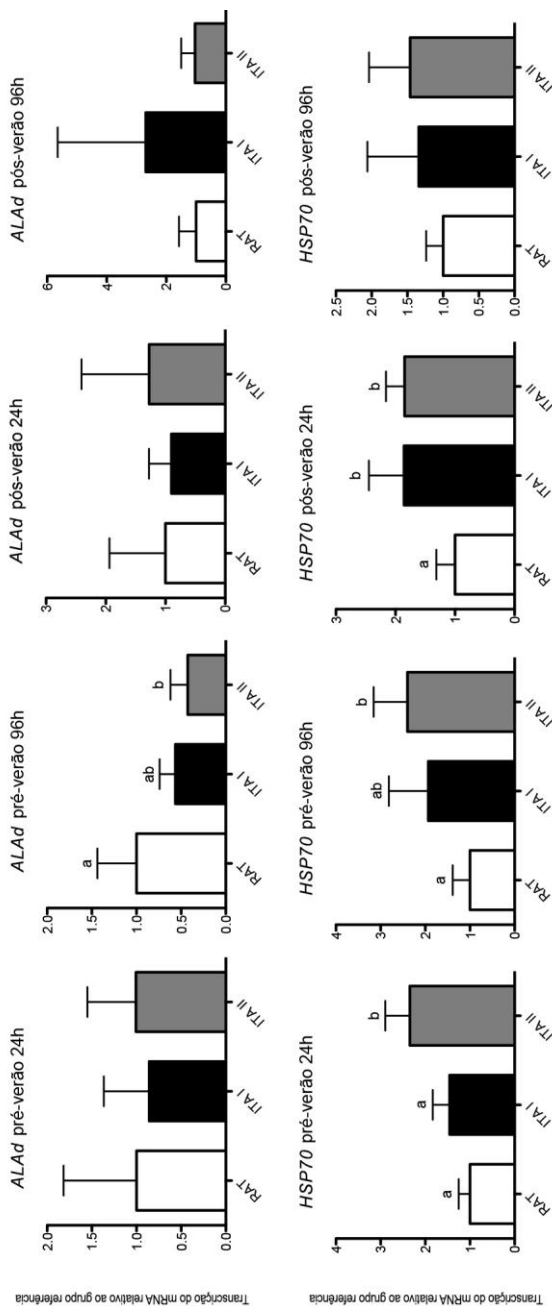


FIGURA 9 – Níveis de transcritos relativos dos genes putativos de *ALAd-like* (*ALAd*) e *HSP70-like* (*HSP70*) em 24h e 96h de exposição, nos experimentos pré-verão e pós-verão. Os níveis de transcritos foram avaliados por *qPCR* e a transcrição nos grupos expostos (ITAII e ITAI) é relativa ao grupo referência (RAT). Letras representam diferenças nos níveis de transcritos ($p < 0.05$).

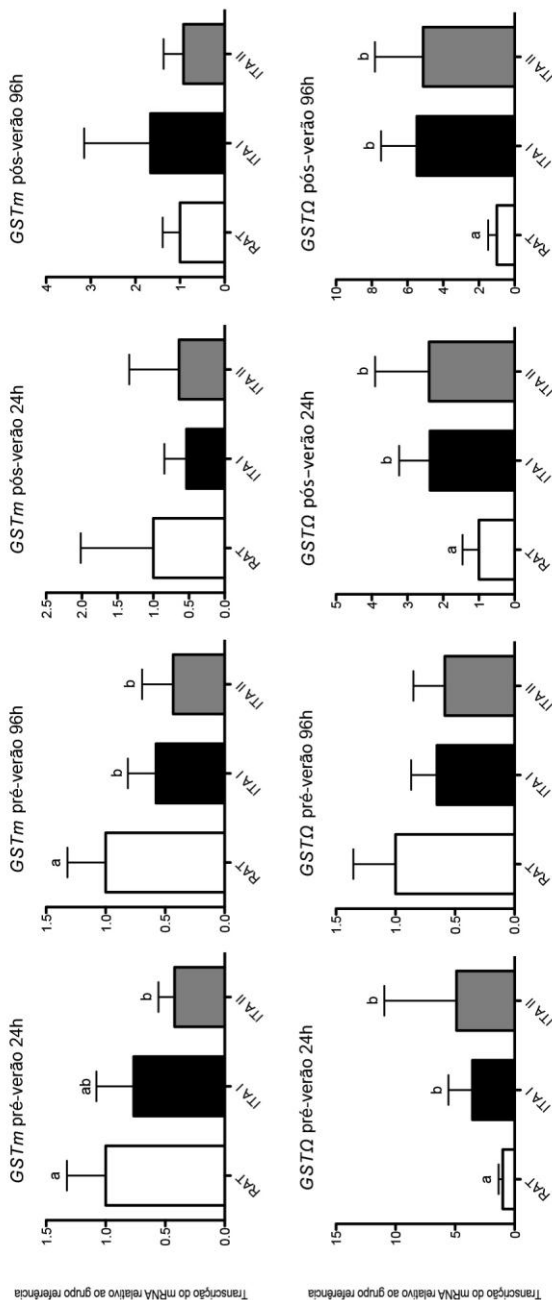


FIGURA 10 – Níveis de transcritos relativos dos genes putativos de *GSTmicrosomal* (*GSTm*) e *GSTômega-like* (*GSTQ*) em 24h e 96h de exposição, nos experimentos pré-verão e pós-verão. Os níveis de transcritos foram avaliados por *qPCR* e a transcrição nos grupos expostos (ITAI e ITAII) é relativa ao grupo referência (RAT). Letras representam diferenças nos níveis de transcritos ($p < 0.05$).

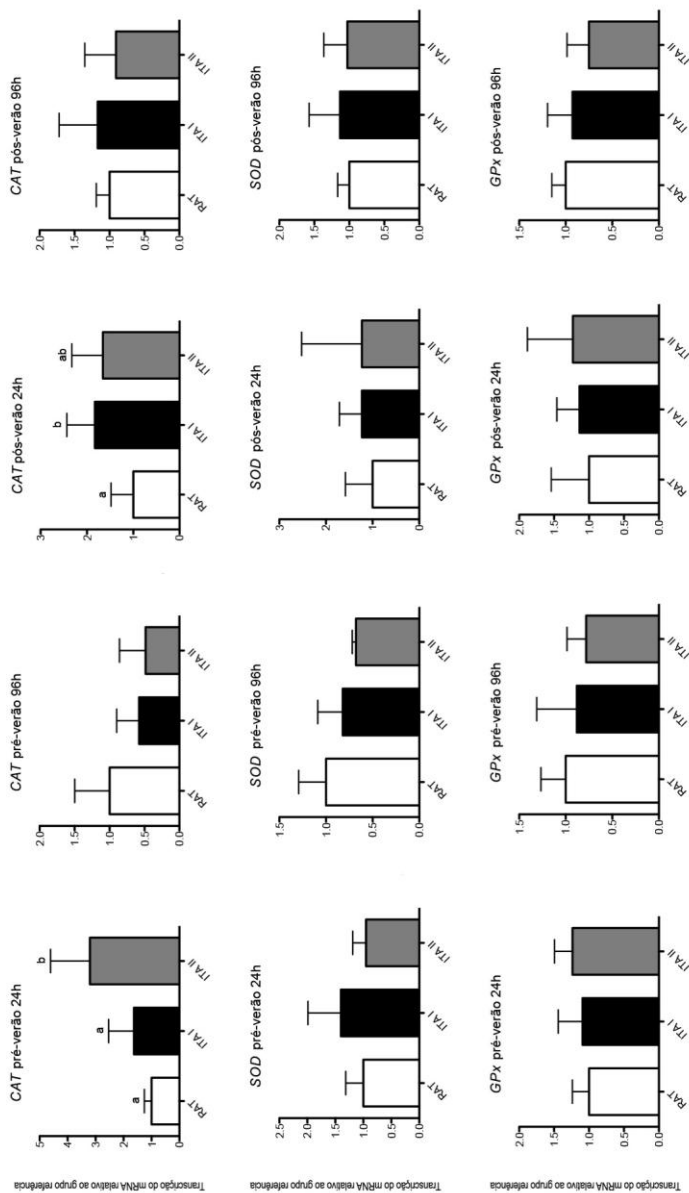


FIGURA 11 – Níveis de transcritos relativos dos genes putativos de *Catalase-like* (CAT), *SOD-like* (SOD) e *GPx-like* (GPx) em 24h e 96h de exposição, nos experimentos pré-verão e pós-verão. Os níveis de transcritos foram avaliados por qPCR e a transcrição nos grupos expostos (ITAI e ITAII) é relativa ao grupo referência (RAT). Letras representam diferenças nos níveis de transcritos ($p < 0.05$)

6. DISCUSSÃO

Os moluscos marinhos têm sido utilizados como organismos sentinela (ou organismos bioindicadores) em diversos estudos focando o monitoramento ambiental (SCANES, 1997; BAINY et al., 2000; CAJARAVILLE et al., 2000; BOUTET et al., 2004; ORTIZ-ZARRAGOITIA; CAJARAVILLE, 2006; PEREIRA et al., 2007; RODRIGUES, 2007; BEBIANNO et al., 2007; KIMBROUGH et al., 2008; MEDEIROS et al., 2008; MILAN et al., 2011; CHAPMAN et al., 2011; LÜCHMANN et al., 2012). A maior parte desses estudos tenta propor a combinação de análises químicas com o emprego de biomarcadores bioquímicos clássicos, os quais seriam uma resposta posterior à transcrição gênica. Por outro lado, alguns destes estudos têm produzido resultados inconsistentes, talvez porque muitos desses biomarcadores têm sua origem na toxicologia humana e não são apropriados para os organismos estudados, como no caso dos moluscos.

Recentemente, com o advento de técnicas de biologia molecular, o contexto e o estado da arte associados ao estudo e à utilização de biomarcadores estão sendo estendidos em nível dos gênico, envolvendo a identificação e a transcrição de genes em espécies modelo, ou seja, ecotoxicogenômica (ORBES et al., 2006). Sequências obtidas a partir do genoma ou do transcriptoma de moluscos bivalves disponibilizaram uma grande quantidade de dados, abrindo caminho para o uso e aplicação da transcrição gênica em estudos ambientais (MILAN et al., 2011; LÜCHMANN, 2012; MELLO et al., 2012).

O presente trabalho buscou avaliar o potencial de genes alvo como possíveis biomarcadores moleculares em *Crassostrea brasiliana*, visando sua utilização como ferramentas ecotoxicológicas no biomonitoramento de manguezais e ambientes estuarinos. Neste contexto, o enfoque deste estudo foi validar a transcrição diferencial de genes responsivos à contaminação por esgoto sanitário. Os níveis dos transcritos destes genes alvo selecionados foram quantificados em brânquias de *C. brasiliana* expostas *in situ* em uma área do manguezal do Itacorubi, em Florianópolis, Ilha de Santa Catarina, SC, considerada, a priori, como contaminada por esgoto sanitário. A seleção dos genes alvo, bem como as suas respectivas sequências parciais utilizadas como referência no presente estudo, foram baseadas no trabalho de Lüchmann (2012), realizados com esta mesma espécie de ostras. Entre os genes selecionados para validação neste estudo em campo foram incluídos preferencialmente genes associados às respostas de defesa, ao estresse oxidativo e à biotransformação de xenobióticos.

A determinação dos parâmetros ambientais da água, como DBO e coliformes fecais, e a análise da presença de contaminantes orgânicos no sedimento, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e alquilbenzenos lineares (LABs), apontam a degradação da área de estudo, o Manguezal do Itacorubi. Ainda foi possível constatar maiores valores de DBO após a temporada de verão, época em que a população da cidade chega a duplicar com a presença de turistas. Um aumento na DBO indica que existe uma maior quantidade de matéria orgânica passível de degradação. Como a matéria orgânica dos resíduos é rapidamente consumida, padrões de distribuição de ácidos graxos e esteróis têm sido usados para estimar o aporte de matéria orgânica de origem antrópica e o seu comportamento em estuários (QUEMENEUR; MARTY, 1992; MATER et al., 2004).

Ainda constatamos a presença de LABs no tecido dos animais em todas as amostras, bem como a bioacumulação de HPAs nos tecidos dos animais durante a exposição pré-verão. Essa bioacumulação de HPAs apenas no experimento pré-verão pode estar relacionada aos eventos pluviométricos. Em outro estudo do nosso grupo de pesquisa, análises de contaminantes orgânicos bioacumulados em *C. rizophora* transplantadas para uma área intensamente impactada na Baía Norte por duas semanas, revelaram concentrações de LABs em todas as amostras e HPAs apenas em alguns pontos, com valores correlacionados a distância da fonte de contaminação (ZANETTE, 2009). A presença de LABs no sedimento pode ser utilizado como indicativo de contaminação aquática decorrente de detergentes de uso doméstico.

O Brasil não possui ainda uma política ou legislação em nível HPAs. Os parâmetros usados são os mesmos de potabilidade para águas superficiais da Portaria MS 1.469, de 29/12/2000, destacando-se: benzeno = 5mg/l, benzo(a)pireno = 0,7mg/l, etilbenzeno = 0,2mg/l, tolueno = 0,17mg/l e xileno = 0,3mg/l. Algumas iniciativas, em termos de legislação, estão sendo tomadas em níveis locais, como é o caso do estado de São Paulo (GUIMARÃES, 2003).

Os níveis de benzo(a)pireno nas amostras de sedimento coletadas na exposição pré-verão foram de 3,90 e 2,10 ng/g, enquanto na exposição pós-verão foram de 2,87 e 4,04 ng/g, em ITAI e ITAII respectivamente, sendo esse o único HPA encontrado no sedimento a nível superior ao estipulado pela legislação para corpos de água. Os baixos níveis encontrados de HPAs, PCBs e metais traço (dados não mostrados), sugerem que esses contaminantes não sejam os principais componentes do esgoto sanitário que ali aporta ou estejam presentes em níveis tão baixos que não chegam a bioacumular nos tecidos durante

uma exposição curta. De fato, recentemente, grande atenção tem sido dada aos contaminantes emergentes presentes no esgoto sanitário, como por exemplo, fármacos, produtos de cuidado pessoal (PPCPs) e outros desreguladores endócrinos (EDCs) (ex.: hidroxianisolo de butirato, bisfenol-A, ftalato, triclosan, nonilfenol, estrona, estradiol e etinilestradiol) (BOLONG et al., 2009).

O CONAMA (2005) define limites para HPAs, metais e PCBs para cada classe de corpo de água, porém os valores máximos são determinados para a água e não para o sedimento. Análises de contaminantes presentes no sedimento e nos tecidos dos animais são muito mais precisas na indicação da presença desses contaminantes do que as análises de água sugeridas pelo CONAMA, isso devido tanto a dinâmica dos corpos de água quanto a capacidade de complexação desses elementos com a matéria orgânica. Segundo a Resolução CONAMA nº 357, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e estabelece padrões, corpos de água salobra são classificados em quatro classes (especial, I, II e III), porém a referida classificação é ambígua. O Manguezal do Itacorubi poderia ser enquadrado mais adequadamente segundo seu uso na classe II. Para esta classe a mesma resolução determina o limite de 2500 NMP/100mL coliformes fecais em pelo menos 80% de 6 amostras coletadas bimestralmente durante o período de um ano (CONAMA, 2005). Praticamente todas as amostras coletadas nos pontos de exposição (ITAI e ITAII) estavam acima desse limite nas duas exposições (pré e pós-verão) enquanto todas amostras coletadas no ponto referência (RAT) estavam abaixo (Figuras 5 e 6). Já a Resolução CONAMA nº 274, que dispõe sobre a balneabilidade, considera área imprópria para banho quando encontrados valores acima do referido limite (CONAMA, 2000).

Em relação aos níveis de transcrição gênica, observou-se a indução da transcrição de alguns genes, conforme já constatado em trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa com outra espécie de ostra exposta a esgoto sanitário em condições controladas em laboratório (MEDEIROS et al., 2008; ZANETTE, 2009). O gene *FABP-like* (*FABP*), cujos níveis de transcrição foram maiores nos grupos expostos *in situ* em ITA, praticamente independente do período sazonal (pré ou pós-verão), pode ser considerado como um gene tipicamente induzido pela exposição a esgoto sanitário. Apesar de terem sido observados os maiores valores em 24h, os níveis de sua transcrição se mantiveram superiores aos níveis observados no grupo referência em 96h. Nossos resultados indicam a resposta deste gene em nível de sua transcrição frente a exposição a esgoto sanitário em campo, corroboram aqueles de

Medeiros et al. (2008) que observaram a indução (43,6 vezes) de FABP nas brânquias de ostras *Crassostrea gigas* expostas a esgoto sanitário não-tratado (33%) em laboratório por 48h.

FABPs são pequenas proteínas citosólicas que fazem ligações não-covalentes com ácidos graxos e outras substâncias lipofílicas, estando envolvidas na absorção e no transporte dos mesmos para diversos compartimentos celulares. Todavia, a função específica de cada tipo de FABP ainda é intrigante (ESTEVES; EHRlich, 2006). Considerando a expressão significativa destas proteínas nos hepatócitos (3-6% do total de proteína) em comparação aos baixos níveis de ácidos graxos no fígado, sugere-se que algumas FABPs estão envolvidas na absorção e no metabolismo de xenobióticos (VELKOV et al., 2005). A transcrição de *FABP* em brânquias de ostras expostas ao esgoto pode estar relacionada com a biotransformação e o metabolismo de detoxificação de compostos lipídicos absorvidos durante a exposição, ou ainda, relacionada à demanda energética para tal propósito (MEDEIROS et al., 2008).

O gene putativo que codifica para a sulfotransferase1C1, o gene *Sulfotransferase1C1-like (SULT)*, mostrou um padrão interessante de comportamento, uma vez que os níveis de transcrição mais elevados ocorreram nos mesmos grupos em que o mesmo foi observado para *FABP*, para todos os momentos, porém em níveis menores. Enquanto na exposição pós-verão os níveis se mantiveram altos nos dois tempos, 24h e 96h, na exposição pré-verão os níveis mostraram valores bem elevados em 24h (*FABP* em ITAI 39,5 e ITAII 9,1 vezes; *SULT* em ITAI 28,5 e ITAII 14,7 vezes) retornando a valores menores em 96h (*FABP* em ITAI 6,8 e ITAII 21,6; *SULT* ITAI 1,8 e ITAII 3,1 vezes). Neste momento, não foi possível constatar diferença significativa nos níveis *SULT*, porém os níveis de *FABP* permaneceram altos especialmente em ITAII, ponto no qual foram constatados os maiores valores para coliformes totais (300.000 NMP/100mL).

Segundo Gamage et al. (2006), as SULTs estão amplamente distribuídas nos tecidos e podem detoxificar vários xenobióticos e bioativar compostos endógenos. A presença de SULT no tecido epitelial do estômago e pulmões de seres humanos sugere que estas enzimas exercem um importante papel no metabolismo extra-hepático de detoxicação e ativação desses compostos. Uma possível sulfotransferase citosólica indentificada em *zebrafish* e classificada como pertencente a família SULT1, apresentou atividade sulfatante especificamente para estrona e 17 β -estradiol, entre outros compostos fenólicos xenobióticos (YASUDA et al., 2005). A exposição a esteróides exógenos

provavelmente causaria o mesmo efeito que a endógenos (LEBLANC et al., 1997).

Os altos valores de *FABP* e *SULT* em 24h na exposição pré-verão podem estar relacionados ao evento pluviométrico que ocorreu entre o tempo 0 e 24h. O ponto ITAI fica localizado a montante do Rio Itacorubi, o maior e que provavelmente recebe a maior quantidade de efluentes de origem antrópica, enquanto o ponto ITAII, mais a jusante, além de sofrer maior influência do estuário, também é alimentado pelo Rio Sertão. Sugere-se que a diferença e a alternância durante a exposição pré-verão entre ITAI e ITAII podem estar relacionados à diferença de tempo com que os contaminantes aportados desde as nascentes levam até a desembocadura ou, ainda, à influência causada pela estuário no ponto ITAII.

Os genes que codificam para o *CYP2A1* e o *CYP2B-like* (*CYP2B*), também tiveram uma transcrição bem acentuada após 24h nas duas exposições (pré e pós-verão) em ambos os grupos expostos *in situ*. Os maiores valores foram verificados no grupo ITAI, cuja indução variou na faixa entre 19,5 a 36,8 vezes, refletindo, provavelmente, ser o ponto que sofre maior influência da contaminação por esgoto sanitário.

Os CYPs têm sido amplamente estudadas em mamíferos, CYP1A é um típico biomarcador de exposição a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (STEGEMAN et al., 2001). A exposição de *Dicentrarchus labrax*, espécie de peixe importante na aquicultura européia, a β -naftoflavona (BNF) induziu a atividade tanto da EROD quanto de CYP1A no fígado em níveis dose-dependente com o pico em 8hs, confirmando esses biomarcadores como sinais precoces à exposição a HPAs e contaminantes aquáticos “HPA-likes”. BNF, um derivado sintético de vários compostos flavonoides naturais é um típico composto “HPA-like” com forte poder de indução da atividade da EROD (GRAVATO; SANTOS, 2002). A indução da transcrição do gene CYP1A em embriões de peixes *Danio rerio* e *Fundulus heteroclitus* foi constatada após a exposição a BNF, mas não a 17- β estradiol (E2). Por outro lado, a condição de hipóxia alterou a transcrição desse gene em *Fundulus heteroclitus* mas não em *Danio rerio* (MCELROY et al., 2012). Poderia sugerir que condição de hipóxia constatada na exposição pós-verão, especialmente em ITAII, pode ter contribuído para a manutenção dos níveis superiores de transcritos dos CYPs até 96h de exposição, o que não ocorreu na exposição pré-verão.

Em invertebrados marinhos, nos quais aparentemente não existem membros homólogos da família CYP1 descritas em mamíferos, foram descobertas outros CYPs pertencentes ao clã 2, os quais são induzidos

por xenobióticos (BOYLE et al., 1998; REWITZ et al., 2003; ZANETTE et al., 2013). No entanto, poucos trabalhos descrevem as funções específicas das diferentes famílias de CYPs, ou CYPs-like, em invertebrados, especialmente em moluscos. Recentemente, foram identificados e caracterizados dois novos genes putativos de CYP1 e três de CYP3 em *Mytilus edulis*. Ao se comparar o nível de transcritos dos mesmos nos diferentes tecidos, verificou-se que a transcrição de CYP1 foi maior na glândula digestiva, enquanto de CYP3 foi mais elevado nos palpos labiais. Todavia, 24h após a exposição por injeção a uma série de agonistas de AhR, entre eles PCBs, foi verificado um aumento significativo de transcritos somente dos genes putativos de um CYP3 nas brânquias dos animais expostos a BNF (ZANETTE et al., 2013).

Medeiros et al. (2008) observaram a indução em 1,9 vezes na transcrição do *CYP356A1* nas brânquias de ostras *C. gigas* expostas em laboratório à água misturada a esgoto sanitário não-tratado (33%). Supõe-se que a transcrição elevada pode estar associada ao aumento da biotransformação de xenobióticos e/ou à presença de desreguladores endócrinos, que são normalmente encontrados na água contaminada por esgoto sanitário. Os CYPs mediam o metabolismo de compostos endógenos e participam na biossíntese de moléculas de sinalização que coordenam os processos de desenvolvimento (REWITZ et al., 2006). A transcrição do *CYP330A1* no hepatopâncreas do carangueijo *Carcinus maenas* foi induzida pelo hormônio de muda E, mas também por fenobarbital (gardenal) e benzo[a]pireno. Esses relatos, indicam, possivelmente, algum grau de similaridade a vertebrados, onde fenobarbital é um típico indutor de CYP2 (BRESNICK, 1993). Em linguados da espécie *Pleuronectes americanus* expostos a 4-nonilfenol, um composto normalmente presente na água de esgoto e que apresenta um forte efeito estrogênico, o *CYP3A* teve a transcrição induzida cerca de 50% (BALDWIN et al., 2005).

No presente estudo os maiores níveis de transcritos do gene *CYP2B* ocorreram em 24hs de exposição, na exposição pré-verão, momento no qual verificou-se os maiores níveis de fenantreno no tecido das ostras, 12,59 e 11,55 ng.g⁻¹ em 24h, chegando a 18,02 e 21,63 ng.g⁻¹ em 96h de exposição, em ITAI e ITAII respectivamente. Lüchmann (2012) ao expor ostras *C. brasiliana* por 24h a fenantreno, 100 e 1000 µg.L⁻¹, em condições controladas em laboratório, verificou um aumento na transcrição entre 9 e 16 vezes de genes putativos que codificam para CYPs da família 2 nas brânquias, na qual *CYP2-like* teve o maior nível (~16 vezes), seguido pelo gene *CYP2AUI* (~12 vezes), comparando ao grupo controle. Sugere-se que os altos níveis de transcritos do gene

CYP2B devem estar relacionados a presença de HPAs, sendo este gene um forte candidato como biomarcador nas brânquias de ostras expostas a fenantreno.

CYP2 é uma subfamília de genes que codificam tanto para catalisadores de uma grande diversidade de xenobióticos assim como hidroxilação de esteróides. No entanto, deve ser tomado cuidado ao relacionar competência funcional a partir de semelhanças de sequência primária, pois mesmo simples substituições de resíduos de aminoácidos em posições chave para os demais níveis estruturais podem acarretar mudanças na competência catalítica da enzima (CHEN et al., 2002). Nesse estudo, a indução observada nos níveis de transcrição dos genes que codificam para *CYP2A1* e *CYP2B* em 24h de exposição em ambos experimentos pode estar relacionada tanto com a biotransformação de xenobióticos quanto com a desregulação endócrina causada por esteróides exógenos.

A redução na transcrição do gene putativo que codifica para a enzima ácido δ -aminolevulínico desidratase, o *ALAd-like* (*ALAd*), em 96h na exposição pré-verão nos grupos expostos poderia estar relacionada com a transcrição das CYPs que retornaram a níveis basais após terem uma transcrição muito elevada em 24h. O *CYP2B* em especial, para o qual se observou uma transcrição de até 33 vezes em 24h, retornou a níveis abaixo do referência em 96h. A ALAd é uma enzima que catalisa o segundo passo da síntese do heme, a adição assimétrica de duas moléculas de ácido aminolevulínico. Heme é um tetrapirrol, e é um componente essencial das várias proteínas que contêm ferro, incluindo as chamadas hemoproteínas como hemoglobina e os citocromos (KELADA et al., 2001). Em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo, foi verificado um aumento de 68% na expressão da enzima 5-aminolevulinato sintase (ALAs) em *C. gigas* expostas por 48h ao esgoto sanitário não-tratado (33%) em laboratório (RODRIGUES, 2007; MEDEIROS et al., 2008). ALAs está presente na mitocôndria e catalisa o primeiro passo da biossíntese de tetrapirróis, promovendo a condensação de succinil-CoA e glicina em ácido aminolevulínico (SHEMIN, 1957). Muitos trabalhos indicam uma co-regulação na síntese de heme pela atividade dos CYPs (RODRIGUES, 2007). O heme livre é encontrado em baixas concentrações no interior das células, pois seu aumento causa efeitos citotóxicos (MAY et al., 1995). Assim, a demanda por heme pode aumentar em resposta ao aumento da síntese e atividade dos CYPs durante a metabolização ou biotransformação de algumas drogas (IBA et al., 1999). Analogamente, a diminuição na síntese dos CYPs também deve reduzir a demanda por heme.

A atividade das GSTs representa um dos mais relevantes parâmetros bioquímicos medidos em estudos ambientais com poluentes químicos (BAINY et al., 2000; PEREIRA et al., 2007). No presente estudo apenas em 96h na exposição pré-verão não foi verificado um maior nível de transcrição da *GSTΩ* nos grupos expostos. Em todos os outros momentos, os níveis de transcritos desse gene nos grupos expostos permaneceram maiores que no grupo referência, sugerindo que durante o verão a atividade dessa enzima pode ser mais elevada. Diversos autores, analisando a atividade enzimática da GST, observaram uma maior atividade durante o verão (BEBIANNO et al., 2007; NUNES, 2008). Baily et al. (2000) correlacionaram o aumento da atividade da GST na glândula digestiva de mexilhões transplantados para uma área contaminada com o possível aporte de xenobióticos pelo lixiviamento causado por eventos de chuva que antecederam o período de exposição.

Os níveis de transcrição *GSTΩ* nos dois grupos expostos foram muito parecidos em praticamente todos os momentos, o que pode sugerir que ela pode estar relacionada com um amplo leque de contaminantes. Além da desintoxicação de xenobióticos eletrofílicos, tais como carcinógenos químicos, poluentes ambientais, e agentes anti-tumorais, essas transferases inativam aldeídos α,β -insaturados endógenos, quinonas, epóxidos, e hidroperóxidos, formados como metabólitos secundários durante o estresse oxidativo. Estas enzimas também estão intimamente envolvidas na biossíntese de leucotrienos, prostaglandinas, testosterona e progesterona, bem como com a degradação da tirosina (HAYES et al., 2005).

A transcrição do gene *GSTΩ* foi induzida em 3,3 vezes em brânquias de ostras *C. gigas* expostas por 48h a uma mistura de água e esgoto sem tratamento (33%) em laboratório (MEDEIROS; SIEBERT; TOLEDO-SILVA; et al., 2008). Supostos genes que codificam para isoformas de *GSTΩ* foram expressos nas brânquias (5,1 vezes) e glândula digestiva (2 vezes) em moluscos bivalves de areia, *Ruditapes Philppinarum*, coletados de uma área poluída na Lagoa de Venice, Itália. Nesse estudo, o transcriptoma revelou cinco classes de GST citosólica (σ , ρ , μ , Ω e π) e uma isoforma microsomal, totalizando em 100 transcritos codificados, dos quais apenas três codificam para *GSTΩ* e esses tiveram os maiores níveis de transcritos. O mesmo estudo revelou também a indução (3,3 vezes) do suposto gene que codifica *GSTmicrosomal*, porém apenas em glândula digestiva (MILAN et al., 2011). Assim como o que ocorreu com a *ALAd* (96h) na exposição pré-verão, observou-se que a transcrição de *GSTmicrosomal-like* nas

brânquias foi negativamente regulada nos grupos expostos (24h e 96h), apesar da pequena diferença entre os grupos.

O fenantreno induziu a expressão de genes que codificam para enzimas do metabolismo de biotransformação, Fase I (*CYP2A1* e *CYP2-like*) e Fase II (*GST Ω -like*), em brânquias de *C. brasiliiana*, enquanto na glândula digestiva apenas o *CYP2A1* foi induzido, por outro lado não houve alteração na atividade de enzimas antioxidantes nos dois tecidos (LÜCHMANN, 2012). Esses resultados reforçam a importância das brânquias no mecanismo de desintoxicação, sendo em moluscos bivalves o tecido que responde mais prontamente à exposição aguda de xenobióticos, sendo 24h de exposição suficientes para desencadear respostas moleculares.

Neste estudo, entre os supostos genes que codificam para as enzimas antioxidantes *Catalase-like* (*CAT*), *SOD-like* (*SOD*) e *GPx-like* e (*GPx*), apenas a transcrição do gene que codifica para a *CAT* foi positivamente regulada em um dos grupos expostos; o que foi observado apenas em 24h de exposição. Na exposição pré-verão no grupo ITAII, o gene *CAT* foi induzido 3,2 vezes, enquanto que na exposição pós-verão no grupo ITAI, ela foi induzida 1,8 vezes e, em ITAII, 1,7 vezes. Porém, o último grupo não apresentou diferença estatística em relação ao grupo referência. A expressão dos supostos genes que codificam para *SOD* e *GPx* não tiveram diferença entre os grupos em nenhum tempo nos dois experimentos. Luna-Acosta et al. (2010), verificaram que os níveis de atividade enzimática de *SOD* e *GPx* em brânquias de *C. gigas* transplantadas não variam entre períodos do ano e idade dos animais, porém constataram uma variação, especialmente nos níveis de *GPx*, em alguns pontos contaminados numa baía poluída por metais traço, pesticidas e HPAs após três meses, sugerindo o uso da atividade dessas enzimas como biomarcador de poluição. Todavia, os autores não observaram nenhum padrão de comportamento entre as diferentes estações e os pontos de exposição. Com os níveis de *SOD* e *GPx* mantendo-se em níveis basais, sugere-se que a concentração de xenobióticos ou o tempo de exposição não foram suficientes para desencadear a expressão desses genes. Porém vale ressaltar que a mesmo uma pequena indução na transcrição do gene *CAT* pode caracterizar a perturbação do balanço pró-oxidante-antioxidante das células considerando a alta capacidade catalítica dessa enzima.

O gene putativo que codifica para a *HSP70-like* (*HSP70*) teve níveis de transcritos superiores ao grupo referência na exposição pré-verão apenas no grupo ITAII em 24h (2,34) e 96h (2,40 vezes), enquanto na exposição pós-verão os níveis de transcritos foram

superiores apenas em 24h nos dois grupos expostos, ITAI (1,86) e ITAI (1,85 vezes). Cho e Jeong (2012), ao analisarem os níveis de *HSP70* em *C. gigas* cultivadas em três profundidades diferentes, relacionaram a sua expressão a condições de hipóxia. Mello et al. (2012) verificaram uma expressão maior que duas vezes em hemócitos de *C. gigas* expostas *in vitro* a 1000µg/L de brevotoxina (PbTx-2), uma neurotoxina produzida por microalgas. A expressão de *HSP70* é bem conhecida como resposta ao estresse ambiental. Em *Crassostrea virginica* sua expressão foi induzida com o aumento da temperatura e com a diminuição do pH (CHAPMAN et al., 2011), assim como a temperatura e a exposição a cobre induziram os níveis desta proteína nas brânquias do mexilhão *Perna perna* exposto em laboratório (KUHNEN, 2001).

Neste estudo em campo, observou-se uma pequena tendência de aumento dos níveis de transcritos do gene *HSP70* nos grupos expostos, o que caracteriza a homogeneidade dos fatores abióticos (temperatura e pH) entre os pontos de exposição e referência. A indução de *HSP70* em resposta à exposição sub-letal a contaminantes ambientais pode ser relacionada à desnaturação e degradação de proteínas celulares (CLAYTON, 1996). No entanto é pouco provável que o curto tempo de exposição viesse a desencadear tais respostas. Os maiores níveis de transcritos de *HSP70* encontrados em ITAI (24h e 96h) no experimento pré-verão, e ITAI e ITAI (24h), no experimento pós-verão, podem estar relacionados a condições de hipóxia devido à eutrofização da área de estudo. Concentrações de *HSP70* em brânquias de mexilhão *P. perna* foram utilizadas para caracterizar uma área contaminada próxima ao nosso local de estudo (KUHNEN, 2001). Neste trabalho, a autora, ao comparar as concentrações de imunocomplexos da *HSP70* após 7, 15, 30 e 60 dias de exposição, no inverno e no verão, verificou uma concentração maior apenas no inverno em 7 e 30 dias de exposição em relação ao grupo referência, ainda que com uma pequena variação. Existem limitações na utilização das concentrações da *HSP70* como biomarcador de contaminação, devido a sua resposta a uma variedade de fatores abióticos, os efeitos inerentes do ciclo reprodutivo, bem como o limiar necessário para a indução de uma resposta (CLAYTON, 1996). Todavia, não se deve subestimar a funcionalidade da expressão de genes putativos da *HSP70* na análise conjunta de uma série de biomarcadores moleculares de contaminação ambiental.

Nos nossos resultados, *CAT*, *GST* e *HSP70*, intrigantemente, tiveram seus maiores níveis de transcrição durante a exposição pré-verão em 24h no ponto ITAI, momento onde aconteceu a maior precipitação pluviométrica acumulada (3,2 mm). Na mesma exposição e também em

24h foram observados os maiores valores entre todos os momentos para a *SULT* (28,5), *CYP2B1-like* (33,3) e *FABP* (39,5 vezes); sendo que esses genes tiveram uma transcrição bem acentuada em relação ao grupo referência, sendo maiores no grupo ITAI. Por sua vez, os maiores valores de *CYP2A1* (36,8 vezes) foram observados também neste grupo em 24h, porém na exposição pós-verão.

A água da chuva certamente escoar grandes quantidades de esgoto não tratado diretamente para os cursos d'água da Ilha de Santa Catarina. Além do que, muitas fossas sépticas são rudimentares e estão saturadas. Assim, ocasionalmente, eventos de chuva facilitam a lixiviação de compostos xenobióticos, o que pode induzir respostas biológicas nos organismos expostos, como o aumento da transcrição dos genes aqui estudados. Após o evento de chuva, a transcrição desses genes retornou a níveis basais (exposição pré-verão 96h), com exceção da *HSP70* que manteve valores similares a 24h e *FABP* que passou a ter os maiores níveis de transcritos no grupo ITAII (21,6 vezes).

Na exposição pré-verão, os genes relacionados ao metabolismo de Fase I (*CYP2B1* e *CYP2A1*) e Fase II (*SULT* e *GSTO*) tiveram uma transcrição elevada em 24h. Já na exposição pós-verão, onde os parâmetros ambientais indicaram uma maior degradação da área de estudo, os genes relacionados à Fase I tiveram uma transcrição elevada em 24h, enquanto aqueles de Fase II tiveram os níveis de transcritos superiores ao grupo referência em 24h, porém mantendo níveis elevados até 96h. Possivelmente os metabólitos formados na Fase I são responsáveis pela manutenção desses níveis. No entanto, não podemos descartar a possibilidade desta relação ser devido a um mecanismo comum de indução, através da ativação de receptores nucleares.

7. CONCLUSÕES

- mRNA correspondente a onze genes selecionados como alvo, relacionados ao metabolismo de biotransformação, à resposta ao estresse, ao metabolismo energético e às respostas de defesa contra o estresse oxidativo foram quantificados nas brânquias de *C. brasiliensis* expostas *in situ* a uma área de manguezal contaminada por esgoto sanitário.
- O gene *FABP* mostrou ser fortemente induzido pela exposição ao esgoto sanitário no ambiente, assim como genes relacionados ao metabolismo de biotransformação de Fase I (*CYP2B1* e *CYP2A1*) e Fase II (*SULT* e *GST*).
- Eventos de precipitação pluviométrica podem alterar potencialmente o nível dos transcritos destes genes no ambiente, em função da consequente lixiviação de contaminantes.
- Em moluscos bivalves, as brânquias são o tecido que responde mais prontamente à exposição aguda a xenobióticos, sendo que um período de exposição ambiental igual a 24h mostrou-se suficiente para desencadear respostas moleculares, associadas à indução dos níveis de transcrição de genes, como *FABP*, *SULT*, *CYP2A1*, *CYP2B*, *HSP70* e *GST*. O mesmo padrão foi observado no caso do *CAT*, mas, no entanto, aparentemente, somente após um aporte maior de contaminantes no ambiente (período pós-verão).
- Os níveis de contaminação ou o tempo de exposição não foram, aparentemente, suficientes para perturbar de forma mais evidente o balanço pró-oxidante/antioxidante das células nas brânquias das ostras expostas no ambiente, uma vez que não foi desencadeado um aumento conspícuo da transcrição dos demais genes analisados, os quais codificam para enzimas relacionadas ao estresse oxidativo.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para que a utilização de um dado biomarcador molecular venha a ser aplicável e útil na avaliação de risco ambiental, deve-se demonstrar que seus níveis de transcrição, e/ou expressão, sejam passíveis de alteração mensurável, ou seja, sofram indução ou repressão, de forma regular e previsível, frente à exposição de organismos sentinelas a agentes xenobióticos presentes no ambiente.

De fato, no presente estudo, os níveis mais elevados de transcritos de *FABP*, *SULT* e *CYPs* (*CYP2B1-like* e *CYP2A1*) em ostras do mangue, *C. brasiliensis*, observados para ITAI em 24h, nas duas exposições *in situ*, permitem sugerir a validação desses genes como biomarcadores de contaminação ambiental por esgoto sanitário. Tendo por base o padrão para eles observado na região de estudo, o manguezal do Itacorubi, poder-se-ia ainda sugerir sua utilização potencial no monitoramento de outras áreas de perfil semelhante, igualmente impactadas por aporte de esgoto sanitário.

No entanto, deve ser considerado que na avaliação específica do grau de impacto ou da qualidade um determinado ambiente, as respostas de biomarcadores têm uma maior chance de serem interpretadas corretamente, quando em comparações mais generalizadas, como no caso da comparação entre ambientes considerados como sendo semelhantes, mas cuja localização geográfica e aporte de contaminação sejam distintos.

Além disso, não se pode deixar de considerar a influência de alguns fatores e características associadas ao organismo sentinela, especialmente aqueles ligados a variações fisiológicas sazonais, como a maturação e a reprodução. Os eventos reprodutivos em ostras estão diretamente relacionados com a variação de temperatura, sendo que a maturação e a eliminação de gametas ocorrem em períodos com temperaturas mais elevadas; o que, na região do nosso estudo (região sul), coincide com o início do verão. As exposições *in situ*, realizadas no presente estudo, de certa forma ocorreram no momento que antecedeu, bem como, após o evento reprodutivo. O fato das análises terem sido realizadas nas brânquias, o tecido que responde mais prontamente à exposição a contaminantes, minimizaria esses efeitos, uma vez que as respostas neste tecido não deveriam ser, aparentemente, diretamente influenciadas por eventos reprodutivos.

Devido ao fato de manguezais serem ambientes estuarinos muito dinâmicos, onde existe uma interação de diversos fatores abióticos, seria interessante que a validação destes genes fosse ampliada em ostras

expostas a outras áreas de manguezal que sofram com o aporte de esgoto sanitário. Neste caso, dever-se-ia considerar a realização das exposições *in situ* em períodos com a mesma fase da lua, mesma estação e mesmo momento reprodutivo dos animais. Todavia, deve ser lembrada ainda a influência dos eventos pluviométricos, os quais tendem a aumentar o aporte de material de origem antrópica, ficando, assim, evidente que essa variável deve ser considerada quando se pretende realizar comparações entre estudos de campo.

Não se deve desconsiderar a complexidade da mistura que o esgoto sanitário representa e a sinergia entre os seus componentes. Sugere-se que novos estudos, através de experimentos sob condições controladas em laboratório, envolvendo a exposição a alguns dos compostos que possivelmente são encontrados no esgoto sanitário, especialmente fármacos, disruptores endócrinos e HPAs, podem contribuir para elucidar o mecanismo de sua biotransformação e associar, de modo mais claro, a transcrição diferencial desses genes a um determinado composto.

Finalmente, esse estudo *in situ*, vem a acrescentar, desvendando genes diferencialmente transcritos, relacionados com a biotransformação de xenobióticos, aumentando o conjunto de potenciais biomarcadores de contaminação aquática em moluscos bivalves, para que estes possam futuramente fomentar programas de monitoramento ambiental.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAINY, A. C. D. Nuclear Receptors in Fish. In: C. A. de O. Almeida, Eduardo Alves de; Ribeiro (Ed.); **Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems There**. p.35–50, 2013. CRC Press.

BAINY, A. C. D.; ALMEIDA, E. A. DE; MÜLLER, I. C.; VENTURA, E. C.; MEDEIROS, I. D. DE. Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Marine environmental research**, v. 50, n. 1-5, p. 411–6, 2000.

BALDWIN, W. S.; ROLING, J. A; PETERSON, S.; CHAPMAN, L. M. Effects of nonylphenol on hepatic testosterone metabolism and the expression of acute phase proteins in winter flounder (*Pleuronectes americanus*): comparison to the effects of Saint John's Wort. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 140, n. 1, p. 87–96, 2005.

BEBIANNI, M. J.; LOPES, B.; GUERRA, L.; HOARAU, P.; FERREIRA, A. M. Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: effect of abiotic factors. **Environment international**, v. 33, n. 4, p. 550–8, 2007.

BOGERS, R.; VRIES-BUITENWEG, S. DE; GEUIJEN, I.; et al. An in vitro/in vivo screening assay as a sensitive tool to assess endocrine disruptive activity in surface water. **Environment international**, v. 33, n. 3, p. 292–301, 2007.

BOLONG, N.; ISMAIL, A. F.; SALIM, M. R.; MATSUURA, T. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. **Desalination**, v. 239, n. 1-3, p. 229–246, 2009. Elsevier B.V.

BOUTET, I.; TANGUY, A.; MORAGA, D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. **Gene**, v. 329, p. 147–57, 2004.

BOYLE, S. M.; GRRENBERG, R. M.; JAMES, M. O. Isolation of CYP2L2 and Two other Cytochrome P450 Sequences from a Spiny Lobster , *Panzdirus argus* , Hepatopancreas cDNA Library. **Marine Environmental Research**, v. 46, n. 1, p. 21–24, 1998.

BRAGA, E. S.; BONETTI, C. V. D. H.; BURONE, L.; BONETTI FILHO, J. Eutrophication and Bacterial Pollution Caused by Industrial and Domestic Wastes at the Baixada Santista Estuarine System - Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 2, p. 165–173, 2000.

BRESNICK, E. Induction of cytochromes P450 1 and P450 2 by xenobiotics. In: J. B. Schenkman; H. Greim (Eds.); **Cytochrome P450**. p.503–524, 1993. Berlin, German: Springer-Verlag.

BUSTIN, S. A; BENES, V.; GARSON, J. A; et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–22, 2009.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the total environment**, v. 247, n. 2-3, p. 295–311, 2000.

CHAPMAN, P. M. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. **Marine pollution bulletin**, v. 44, n. 1, p. 7–15, 2002.

CHAPMAN, R. W.; MANCIA, A.; BEAL, M.; et al. The transcriptomic responses of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, to environmental conditions. **Molecular ecology**, v. 20, n. 7, p. 1431–49, 2011.

CHEN, J.-S.; BERENBAUM, M. R.; SCHULER, M. A. Amino acids in SRS1 and SRS6 are critical for furanocoumarin metabolism by CYP6B1v1, a cytochrome P450 monooxygenase. **Insect molecular biology**, v. 11, n. 2, p. 175–86, 2002.

CHO, E.; JEONG, H. Effect of environmental impact to molecular expression of heat-shock protein (HSP70) in oyster *Crassostrea gigas*

from Gamak bay , Korea. **Journal of Enviromental Biology**, , n. 33, p. 609–615, 2012.

CLAYTON, M. E. **Lipoproteins and Heat Shock Proteins as Measures of Reproductive Physiology in the Soft Shell Clam *Mya arenaria***, 1996. Phd Thesis. MIT/WHOI Joint Program in Biological Oceanography, Woods Hole Oceanographic Institution, USA.

COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MYERS, J. P. **Our Stolen Future**. New York, USA: Plume, 1997.

CONAMA. RESOLUÇÃO No 274, de 29 de novembro de 2000. ,2000. Brasil: CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE.

CONAMA. RESOLUÇÃO No 357, de 17 de março de 2005. ,2005. Brasil: CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE.

COSTA, B. S. **Universalização do Saneamento Básico Utopia ou Realidade**, 2010. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

DUDGEON, D.; ARTHINGTON, A. H.; GESSNER, M. O.; et al. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 81, n. 2, p. 163–82, 2006.

EPA, U. S. E. P. A. **Guidelines for Ecological Risk Assessment**. 1998.

ESTEVES, A.; EHRLICH, R. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 142, n. 3-4, p. 262–74, 2006.

FERREIRA, J. F.; OLIVEIRA NETO, F. M. DE. **Cultivo de moluscos em santa catarina**. 2006.

GALLOWAY, T. S. Biomarkers in environmental and human health risk assessment. **Marine pollution bulletin**, v. 53, n. 10-12, p. 606–13, 2006.

GAMAGE, N.; BARNETT, A.; HEMPEL, N.; et al. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 90, n. 1, p. 5–22, 2006.

GRAVATO, C.; SANTOS, M. A. Beta-naphthoflavone liver EROD and erythrocytic nuclear abnormality induction in juvenile *Dicentrarchus labrax* L. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 52, n. 1, p. 69–74, 2002.

GUIMARÃES, C. H. D. **Avaliação de Risco Ambiental de Sítios Contaminados por Hidrocarbonetos de Petróleo**, 2003. Tese de Mestrado. Programa de Pós Graduação de Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York, USA: Oxford University Press, 2007.

HANNEMANN, F.; BICHET, A.; EWEN, K. M.; BERNHARDT, R. Cytochrome P450 systems--biological variations of electron transport chains. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1770, n. 3, p. 330–44, 2007.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 45, p. 51–88, 2005.

HIGHTOWER, L. E. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. **Cell**, v. 66, n. 2, p. 191–7, 1991.

HONKAKOSKI, P.; NEGISHI, M. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. **The Biochemical journal**, v. 347, n. Pt 2, p. 321–37, 2000.

IBA, M. M.; ALAM, J.; TOUCHARD, C.; et al. Coordinate up-regulation of CYP1A1 and heme oxygenase-1 (HO-1) expression and modulation of delta-aminolevulinic acid synthase and tryptophan pyrrolase activities in pyridine-treated rats. **Biochemical pharmacology**, v. 58, n. 4, p. 723–34, 1999.

IBGE. **Indicadores Desenvolvimento Sustentável Brasil 2010**. Rio de Janeiro, 2010.

INMET. BDMET - Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br>>.

IWAKA, G. K.; THOMAS, P. T.; FORSYTH, R. B.; VIJAYAN, M. M. Heat shock protein expression in fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. v. 56, p.35–56, 1998.

KELADA, N. S.; SHELTON, E.; KAUFMANN, R. B.; KHOURY, M. J. δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Genotype and Lead Toxicity: A HuGE Review. **American Journal of Epidemiology**, v. 154, n. 1, 2001.

KENNISH, M. J. **Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects (Marine Science)**. 1st ed. CRC Press, 1991.

KIMBROUGH, K. L.; JOHNSON, W. E.; LAUENSTEIN, G. G.; CHRISTENSEN, J. D.; APETI, D. A. **An Assessment of Two Decades of Contaminant Monitoring in the Nation's Coastal Zone**. 2008.

KUHNEN, S. **Avaliação do uso das proteínas de estresse (Hsp70) como biomarcadores de contaminação ambiental no mexilhão Perna perna**, 2001. Tese de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

KURELEC, B. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 1, n. 22, p. 23–43, 1992.

LEBLANC, G. A.; BAIN, L. J.; CAROLINA, N. Chronic Toxicity of Environmental Contaminants. **Sentinels and Biomarkers**, v. 105, n. February, p. 65–80, 1997.

LOSSO, C.; GHIRARDINI, A V. Overview of ecotoxicological studies performed in the Venice Lagoon (Italy). **Environment international**, v. 36, n. 1, p. 92–121, 2010. Elsevier Ltd.

LÜCHMANN, K. H. **Respostas Bioquímicas e moleculares em ostras do mangue, Crassostrea brasiliana, expostas a diferentes contaminantes ambientais**, 2012. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

LÜCHMANN, K. H.; MATTOS, J. J.; SIEBERT, M. N.; et al. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 105, n. 3-4, p. 652–60, 2011.

LÜCHMANN, K. H.; MATTOS, J. J.; SIEBERT, M. N.; et al. Suppressive subtractive hybridization libraries prepared from the digestive gland of the oyster *Crassostrea brasiliana* exposed to a diesel fuel water-accommodated fraction. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 31, n. 6, p. 1249–53, 2012.

LUNA-ACOSTA, A.; BUSTAMANTE, P.; GODEFROY, J.; FRUITIER-ARNAUDIN, I.; THOMAS-GUYON, H. Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on the health status of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* exposed in situ. **Environmental science and pollution research international**, v. 17, n. 4, p. 999–1008, 2010.

MATER, L.; ALEXANDRE, M. R.; HANSEL, F. A.; MADUREIRA, L. A. S. Assessment of Lipid Compounds and Phosphorus in Mangrove Sediments of Santa Catarina Island, SC, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 5, p. 725–734, 2004.

MAY, B. K.; DOGRA, S. C.; SADLON, T. J.; et al. Molecular Regulation of Heme Biosynthesis in Higher Vertebrates. In: W. E. C. and K. M. B. T.-P. in N. A. R. and M. Biology (Ed.); v. Volume 51, p.1–51, 1995.

MCELROY, A.; CLARK, C.; DUFFY, T.; et al. Interactions between hypoxia and sewage-derived contaminants on gene expression in fish embryos. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 108, p. 60–9, 2012.

MEDEIROS, I. D.; SIEBERT, M. N.; TOLEDO E SILVA, G. DE; et al. Differential gene expression in oyster exposed to sewage. **Marine environmental research**, v. 66, n. 1, p. 156–7, 2008.

MEDEIROS, I. D.; SIEBERT, M. N.; TOLEDO-SILVA, G.; et al. Induced gene expression in oyster *Crassostrea gigas* exposed to sewage. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 26, n. 3, p. 362–5, 2008.

MELLO, D. F.; OLIVEIRA, E. S. DE; VIEIRA, R. C.; et al. Cellular and transcriptional responses of *Crassostrea gigas* hemocytes exposed in vitro to brevetoxin (PbTx-2). **Marine drugs**, v. 10, n. 3, p. 583–97, 2012.

MILAN, M.; COPPE, A.; REINHARDT, R.; et al. Transcriptome sequencing and microarray development for the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: genomic tools for environmental monitoring. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 234, 2011. BioMed Central Ltd.

MOORE, M. N.; DEPLEDGE, M. H.; READMAN, J. W.; PAUL LEONARD, D. R. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutation research**, v. 552, n. 1-2, p. 247–68, 2004.

NUNES, F. F. **Avaliação in situ da contaminação e dos efeitos de efluentes domésticos sobre biomarcadores bioquímicos em ostra do pacífico *Crassostrea gigas* na baía norte da ilha de santa catarina**, 2008. Tese de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

ORBES, V. A. E. F.; ALMQVIST, A. N. P.; ACH, L. I. S. B. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 272–280, 2006.

ORTIZ-ZARRAGOITIA, M.; CAJARAVILLE, M. P. Biomarkers of exposure and reproduction-related effects in mussels exposed to endocrine disruptors. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 50, n. 3, p. 361–9, 2006.

PARASHAR, U. D.; HUMMELMAN, E. G.; BRESEE, J. S.; MILLER, M. A; GLASS, R. I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 5, p. 565–72, 2003.

PEREIRA, C. D. S.; ABESSA, D. M. DE S.; BAINY, A. C. D.; et al. Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 462–469, 2007.

PETROVIC, M. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 685–696, 2003.

PMF. **Agenda 21 Local do município de Florianópolis: meio ambiente quem faz é a gente**. Florianópolis, 2000.

PRIETO-ÁLAMO, M. J.; OSUNA-JIMÉNEZ, I.; ABRIL, N.; et al. Omics Methodologies : New Tools in Aquaculture Studies. ,2010.

QUEMENEUR, M.; MARTY, Y. Sewage influence in a macrotidal estuary: Fatty acid and sterol distributions. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 34, n. 4, p. 347–363, 1992.

RAND, G. M. **Fundamentals of Aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. Washington, USA: Taylor & Francis Publishing, 1995.

REGOLI, F.; GIULIANI, M. E. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. **Marine environmental research**, 2013.

REWITZ, K. F.; STYRISHAVE, B.; LØBNER-OLSEN, A.; ANDERSEN, O. Marine invertebrate cytochrome P450: emerging insights from vertebrate and insects analogies. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 143, n. 4, p. 363–81, 2006.

REWITZ, K.; STYRISHAVE, B.; ANDERSEN, O. CYP330A1 and CYP4C39 enzymes in the shore crab *Carcinus maenas*: sequence and expression regulation by ecdysteroids and xenobiotics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 310, n. 2, p. 252–260, 2003.

RODRIGUES, T. B. **Expressão do gene da Aminolevulinato Sintase (ALAS) na ostra *Crassostrea gigas* exposta à esgoto doméstico**, 2007. Tese de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

SAAVEDRA, C.; BACHÈRE, E. Bivalve genomics. **Aquaculture**, v. 256, n. 1-4, p. 1–14, 2006.

SÁNCHEZ DALOTTO, R. A. **Estruturação de dados como suporte à gestão de manguezais utilizando técnicas de geoprocessamento**, 2003. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação de Engenharia Civil da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

SANDERS, B. M.; MARTIN, L. S.; NELSON, W. G.; PHELPS, D. K.; WELCH, W. Relationships between accumulation of a 60 kDa stress protein and scope-for-growth in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations. **Marine Environmental Research**, v. 31, n. 2, p. 81–97, 1991.

SANTOS, A. A. DOS; NOVAES, A. L. T.; SILVA, F. M.; et al. **Síntese Informativa da Maricultura 2012**. 2012.

SCANES, P. “Oyster Watch”: Monitoring Trace Metal and Organochlorine Concentrations in Sydney ’ s Coastal. **Marine Pollution Bulletin**, v. 33, n. 96, p. 226–238, 1997.

SERAFIM, C. F. S.; HAZIN, F. O ecossistema costeiro. **Geografia : o mar no espaço geográfico brasileiro**, 2005. Brasília.

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. M.; DOWD, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemistry Journal**, v. 16, p. 1–16, 2001.

SHEMIN, D. The Biosynthesis of Hemoglobin: The Biosynthesis of Porphyrin. In: N. R. C. The Division of Medical Sciences, The National Heart Institute, National Institutes of Health (Ed.); **Conference on Hemoglobin**. p.318, 1957. National Academy of Sciences.

SILVA, A. Z. DA; ZANETTE, J.; FERNANDO FERREIRA, J.; et al. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 62, n. 3, p. 376–82, 2005.

SMITH, V. H.; JOYE, S. B.; HOWARTH, R. W. Eutrophication of freshwater and marine ecosystems. **Limnology and Oceanography**, v. 51, n. 1_part_2, p. 351–355, 2006.

SORIANO-SIERRA, E. J.; SILVA, J. R. B. M.; DERNER, R. B.; BRANCO, J. O. Aspectos ecológicos do Manguezal de Itacorubí, Santa Catarina, Brasil. In: E. Soriano-Sierra; B. S. de Ledo (Eds.); **Ecologia e Gerenciamento do Manguezal de Itacorubí**. p.115–138, 1998. Florianópolis: NEMAR/CCB/UFSC, SDM/FEPEMA.

SOUZA FILHO, J. **A expansão da aquíicultura: a situação no Brasil**. 2001.

SOVERNIGO, M. H. Manguezal Do Itacorubi (Florianópolis, Sc): Uma Revisão Da Disponibilidade De Dados Ecológicos Visando O Direcionamento De Novos Estudos. **Oecologia Australis**, v. 13, n. 04, p. 575–595, 2009.

STEGEMAN, J. J.; SCHLEZINGER, J. J.; CRADDOCK, J. E.; TILLITT, D. E. Cytochrome P450 1A expression in midwater fishes: potential effects of chemical contaminants in remote oceanic zones. **Environmental Science Technology**, , n. 35, p. 54–62, 2001.

TOLEDO-SILVA, G.; SIEBERT, M. N.; MEDEIROS, I. D.; et al. Cloning a new cytochrome P450 isoform (CYP356A1) from oyster *Crassostrea gigas*. **Marine environmental research**, v. 66, n. 1, p. 15–8, 2008.

VALENTI, W. C. AQUICULTURA SUSTENTÁVEL. Congresso de Zootecnia, 12o, Vila Real, Portugal, 2002. **Anais...** p.111–118, 2002. Anais da Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos.

VELKOV, T.; CHUANG, S.; PRANKERD, R.; et al. An improved method for the purification of rat liver-type fatty acid binding protein from *Escherichia coli*. **Protein expression and purification**, v. 44, n. 1, p. 23–31, 2005.

VENTURA, E. C. **Biomarcadores Bioquímicos em *Orthopristis ruber* (Cuvier, 1830) (Perciformes – Haemulidae) e *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) (Perciformes – Sciaenidae), coletados na costa sudeste brasileira**, 2004. Tese de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

VIEIRA, S. J. **Transdisciplinaridade aplicada à gestão ambiental de unidade de conservação. Estudo de caso: Manguezal do Itacorubi**, 2007. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação de Engenharia Civil da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

WALKER, C. H.; SIBLY, R. M.; HOPKIN, S. P.; PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology**. London: Taylor & Francis Publishing, 1996.

WANG, C.; CROLL, R. P. Estrogen binding sites in the sea scallop: characterization and possible involvement in reproductive regulation. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 148, n. 3, p. 303–13, 2007.

WEI, P.; ZHANG, J.; EGAN-HAFLEY, M.; LIANG, S.; MOORE, D. D. The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. **Nature**, v. 407, n. 6806, p. 920–3, 2000.

WHO, W. H. O. **Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation**. Geneva, 2001.

XIE, W.; BARWICK, J. L.; SIMON, C. M.; et al. Reciprocal activation of Xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR / PXR and CAR. **Genes & Development**, p. 3014–3023, 2000.

YASUDA, S.; KUMAR, A P.; LIU, M.-Y.; et al. Identification of a novel thyroid hormone-sulfating cytosolic sulfotransferase, SULT1 ST5, from zebrafish. **The FEBS journal**, v. 272, n. 15, p. 3828–37, 2005.

ZANETTE, J. **Identificação e caracterização de marcadores moleculares para estudos ecotoxicológicos em moluscos bivalves e peixes**, 2009. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

ZANETTE, J.; JENNY, M. J.; GOLDSTONE, J. V.; et al. Identification and expression of multiple CYP1-like and CYP3-like genes in the bivalve mollusk *Mytilus edulis*. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 128-129, p. 101–12, 2013.

ZHANG, G.; FANG, X.; GUO, X.; et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 49–54, 2012.